UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON SCHWEINEPANKREASKALLIKREIN AUF DIE SPERMATOGENESE DER RATTE

Sabine Kleeberg-Ruppert

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535715_0018

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON SCHWEINEPANKREASKALLIKREIN AUF DIE SPERMATOGENESE DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Sabine Kleeberg-Ruppert
aus
Hamburg

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. D. Giesecke

Tag der Promotion: 23. Februar 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	3
2.1	Die Spermatogenese	3
2.1.1	Die Hodenentwicklung und die Präspermatogenese bei der Ratte	4
2.1.2	Die Spermatogenese der präpubertären Ratte	7
2.1.3	Die Spermatogenese der adulten Ratte	11
2.1.4	Die Sertolizellen	19
2.2	Steuerung und Beeinflussung der Spermatogenese	21
2.2.1	Hormonale Steuerung der Spermatogenese	21
2.2.2	Störungen der Spermatogenese durch spezifisch angreifende Noxen	23
2.2.2.1	Wärme als Noxe	23
2.3	Das Kallikrein-Kinin-System	27
2.3.1	Vorkommen und Bedeutung für den Organismus	30
2.4	Kallikrein	32
2.4.1	Schweinepankreaskallikrein	36
2.4.2	Das Kallikrein-Kinin-System und die Zellteilung	37
2.4.3	Kallikrein und das Hypophysen-Gonaden-System	42
2.4.4	Das Kallikrein-Kinin-System und die männliche Gonade	45

		Seite
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	54
3.1	Material und Methode	54
3.1.1	Versuchstiere	54
3.1.2	Kallikrein	55
3.1.3	Behandlungsmodelle	56
3.1.3.1	Einmalige Kallikreinapplikation bei präpubertären Ratten	56
3.1.3.2	Langzeitmedikation bei präpubertären Ratten	57
3.1.3.3	Langzeitmedikation bei adulten Ratten mit experimentell geschädigter Spermatogenese	58
3.1.4	Tötung der Tiere und Aufarbeitung der Organe	62
3.1.5	Histologische und histometrische Untersuchungen	63
3.1.5.1	Zellzahlbestimmungen	64
3.1.5.2	Mitoseindex	66
3.1.5.3	Bestimmung des Tubulusdurchmessers	67
3.1.5.4	Bestimmung des prozentualen Flächenanteils des Germinativums	68
3.1.5.5	Parameter für die Beurteilung der Hodenschädigung und die Regeneration des Keimepithels	69
3.1.5.6	Auswertung der Autoradiogramme	70
3.1.6	Versuche zur Bestimmung biochemischer Parameter	71
3.1.7	Testverfahren für die Bestimmung der biochemischen Parameter	73
3.1.8	Statistik	74
3.2	Ergebnisse	75
3.2.1	Einfluß einer einmaligen Kallikreinapplikation auf das Keimepithel der 5 Tage alten Ratte	75

Seite

3.2.2 Einfluß einer Langzeitmedikation mit Kallikrein auf die Spermatogenese der präpubertären Ratte 82

3.2.3 Einfluß einer Langzeitmedikation mit Kallikrein auf die Regeneration eines experimentell geschädigten Keimepithels bei postpubertären Ratten 92

3.2.4 Biochemische Parameter 99

3.2.4.1 Hemmkapazität von Seren juveniler männlicher Ratten 99

3.2.4.2 Hemmung von Schweinepankreaskallikrein "in vitro" durch Seren juveniler männlicher Ratten 100

3.2.4.3 Einfluß einer einmaligen Applikation von Kallikrein auf die aus Rattenplasma freisetzbare Menge von Bradykinin 104

4. DISKUSSION 107

5. ZUSAMMENFASSUNG 121

6. LITERATURVERZEICHNIS 125

LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

Seit der Entdeckung des Kallikrein-Kinin-Systems ist immer wieder die Frage gestellt worden, welche Rolle diesem, im Organismus weitverbreiteten System für den Ablauf physiologischer und pathologischer Prozesse zukommt. Am längsten bekannt und bisher am besten untersucht sind die durch die Kinine hervorgerufenen pharmakologischen Wirkungen, wie zum Beispiel Blutdrucksenkung und Erhöhung der Kapillarpermeabilität.

In den letzten Jahren haben darüber hinaus zwei zum Teil eng miteinander verbundene Fragen immer mehr an Interesse und Bedeutung gewonnen:

Welche Bedeutung haben die Kallikreine bzw. Kinine für das Fortpflanzungsgeschehen?

Welche Rolle spielen sie auf zellulärer Ebene hinsichtlich Zellteilung und Zellmetabolismus?

Von der Möglichkeit einer Beeinflussung männlicher oder weiblicher Geschlechtsorgane durch Kallikrein bzw. Kinin wurde vereinzelt schon in älteren Arbeiten berichtet.

In neuerer Zeit konnten bei intensiven experimentellen und klinischen Untersuchungen in Fällen von Oligo- und Asthenozoospermie beim Menschen durch die Verabreichung von Kallikrein eine Stimulierung der Spermienmotilität und des Zellstoffwechsels sowie eine Zunahme der Gesamtspermienzahl im Ejakulat festgestellt werden.

Beobachtungen an isolierten Zellsystemen von Thymozyten und Knochenmarkszellen sowie auch am lebenden Tier geben Hinweise dafür, daß das Kallikrein-Kinin-System in zellu-

läre Prozesse im Sinne einer echten Mitosestimulierung eingreifen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Schweinepankreaskallikrein auf die Spermatogenese der prä- und postpubertären Ratte untersucht.

2. LITERATUR

2.1 Die Spermatogenese

Der Spermatogenese des adulten Tieres gehen die fetale Hodenentwicklung mit der Evolution und Proliferation der frühen Geschlechtszellen und die Differenzierung der Gonaden voraus (ORTAVANT, COUROT und HOCHEREAU, 1969; CLERMONT, 1972). Es folgt die Spermatogenese des präpubertären Tieres, in deren Verlauf es zur Ausbildung eines funktionstüchtigen Keimepithels kommt.

Untersuchungen über die Spermatogenese sind bisher bei sehr vielen Säugetieren und dem Menschen durchgeführt worden, so zum Beispiel für das Rind und das Schaf von ORTAVANT (1954 und 1956), für die Maus von OAKBERG (1956), für das Schwein von SWIESTRA (1968), für den Menschen von HELLER und CLERMONT (1963) und für die Ratte von LEBLOND und CLERMONT (1952a,b). Die Spermatogenese der Ratte gilt ihrer Übersichtlichkeit und strengen Gesetzmäßigkeit wegen als Modell für die Spermatogenese beim Säuger allgemein.

Die Gesetzmäßigkeiten im Ablauf der Samenzellbildung wurden von verschiedenen Autoren schon sehr früh beobachtet (zum Beispiel v. EBNER, 1888; REGAUD, 1901; v. LENHOSSEK, 1898). Detaillierte Kenntnisse, nicht nur über den histologischen Aufbau des Keimepithels, sondern auch über die Kinetik der Spermatogenese, konnten jedoch erst gewonnen werden, nachdem es möglich geworden war, mit Hilfe neuer Methoden einzelne Vorgänge getrennt zu betrachten und selektiv in die Spermatogenese einzugreifen. Zu diesen Methoden gehören die von LEBLOND und CLERMONT (1952b) beschriebene PAS-Färbung (Periodic acidfuchsin sulfurous acid technic), die selektive Schädigung des Keimepithels mit Röntgenstrahlen (OAKBERG, 1956) und autoradiographische

Verfahren (QUASTLER und SHERMAN, 1959; HILSCHER und MAURER, 1962). Die beiden letzten Verfahren erlauben eine genaue Zeitbestimmung der Spermatogenese.

HILSCHER et al. (1972d, 1974a) und HILSCHER (1973) haben die einzelnen Abschnitte der Samenzellbildung bei der Ratte vom Auftreten der ersten Geschlechtszellen bis zur Bildung reifer Spermien in drei Phasen unterteilt. Dies sind die prägonadale Phase, die Präspermatogenese und die Spermatogenese des prä- und postpubertären Tieres.

2.1.1 Die Hodenentwicklung und die Präspermatogenese bei der Ratte

Während es über die Präspermatogenese der Ratte viele Untersuchungen gibt, liegen über die Anfänge der Geschlechtszellentwicklung bei dieser Spezies nur wenige Angaben vor. Detaillierte Untersuchungen gibt es dagegen für andere Tierarten, so für den Hund und das Rind (GIER und MARION, 1970), für die Maus (BLANDAU, 1963; KRAUSE, 1973) und für den Menschen (WITSCHI, 1948; WARTENBERG, 1976). Danach verläuft die fetale Hodenentwicklung bei allen untersuchten Säugern nach demselben Prinzip.

Die Gametogenese beginnt mit dem Auftreten der ersten differenzierbaren, das heißt PAS-positiven Urgeschlechtszellen im Dottersackgewebe (GIER und MARION, 1970). Diese Zellen, die von HILSCHER et al. (1974a) als primordiale Geschlechtszellen bezeichnet werden, wandern aktiv über das Mesenterium und die Darmanlage in das Gebiet der späteren Gonadenanlage ein (GIER und MARION, 1970). Dies erfolgt nach HILSCHER und HILSCHER (1976) am 11. und 12. Tag p.c. (post conceptionem). Da sich dieser Abschnitt der Entwicklung außerhalb der Gonade vollzieht, wird er als prägonadale Phase bezeichnet (HILSCHER et al., 1974a). Es schließt sich

die Präspermatogenese an, die sich über den Zeitpunkt der Geburt hinaus erstreckt und deshalb in eine prä- und eine postnatale Phase unterteilt wird (HILSCHER et al., 1972d).

Die primitiven Gonaden werden bei der Ratte am 13. Tag p.c. (HILSCHER et al., 1974b; EDDY, 1974) angelegt. Die geschlechtsspezifische Differenzierung findet kurz darauf, am 14. und 15. Fetaltag, statt (BEAUMONT und MANDL, 1963; JOST, 1972; HILSCHER et al., 1976). Dabei kommen die primordialen Geschlechtszellen in den sich bildenden Keimsträngen zu liegen. Sie sind bereits zu diesem Zeitpunkt von den Vorläufern der späteren Sertolizellen, den Stützzellen, umgeben (HILSCHER und MAKOSKI, 1968). Um den 15. Fetaltag treten auch die ersten Wandzellen auf (EIGEL et al., 1974). Zum selben Zeitpunkt werden die Leydigzellen angelegt (ROOSEN-RUNGE und ANDERSON, 1959).

In der nun folgenden Zeit bis zur Geburt und dann bis zum 5. Lebenstag machen die einzelnen Zellarten eine ganz unterschiedliche Entwicklung durch. Aus den primordialen Geschlechtszellen, die sich vor der Einwanderung in die Gonade durch ständige Proliferation stark vermehrt haben, entstehen nach einigen weiteren Teilungen um den 15. Tag p.c. die M-Prospermatogonien (= multiplying prospermatogonia) oder Gonozyten I (HILSCHER et al., 1974a; HILSCHER und HILSCHER, 1976). Am 17. Fetaltag tritt die letzte Generation der M-Prospermatogonien in die Mitose ein. Die Tochterzellen werden als T_1-Prospermatogonien (= primary transitional prospermatogonia) oder Gonozyten II bezeichnet. Diese machen nun eine etwa 10 Tage dauernde Ruhephase durch (HILSCHER et al., 1974a). Ihr Mitoseindex fällt von 7,4 % am 15. Tag p.c. auf 0 % am 19. Tag p.c. (HILSCHER et al.,1972d).

Kurz nach der Geburt, besonders um den 4. Lebenstag, degeneriert ein Teil der T_1-Prospermatogonien (HILSCHER

und HILSCHER, 1976; BEAUMONT und MANDL, 1963; HILSCHER und MAKOSKI, 1968). Nach ROOSEN-RUNGE und LEIK (1968) werden die degenerierten Zellen von Stützzellen phagozytiert.

Durch das enorme Wachstum der Gonade um den Zeitpunkt der Geburt (ROOSEN-RUNGE und LEIK, 1968; HILSCHER et al., 1974a); CLERMONT und HUCKINS, 1961) und durch den oben genannten Untergang vieler Prospermatogonien erscheinen jetzt nur noch vereinzelt Geschlechtszellen im histologischen Präparat, während sie vorher das Bild beherrschten. So beträgt die durchschnittliche Anzahl pro Tubulusquerschnitt am 5. Lebenstag nur noch 1,1 Zellen gegenüber 16,9 Zellen am 18. Fetaltag (HILSCHER et al., 1972d).

Um den 4. Lebenstag wandern die bis dahin zentral gelegenen Prospermatogonien an die Peripherie der Keimstränge, die jetzt als Tubuli seminiferi angesprochen werden können (HILSCHER und MAKOSKI, 1968; BEAUMONT und MANDL, 1963). Dort sollen die Geschlechtszellen mit einem pseudopodienartigen Plasmafortsatz Kontakt mit der Basalmembran aufnehmen (NOVI und SABA, 1968).

Ebenfalls am 4. Lebenstag treten die T_1-Prospermatogonien in die S-Phase (Synthese-Phase) ein. Diese dauert 11,5 Stunden (HILSCHER et al., 1972c). Einen Tag später, am 5. Tag p.p. besteht ein "steady state" zwischen Zellen, die in die S-Phase ein- bzw. austreten (HILSCHER et al., 1972b; HILSCHER et al., 1974a). Die Teilung der T_1-Prospermatogonien erfolgt zwischen dem 4. und 6. Lebenstag. Die Tochterzellen werden als T_2-Prospermatogonien (= secondary transitional prospermatogonia) angesprochen. Aus ihnen entstehen durch eine weitere mitotische Teilung die A-Spermatogonien (HILSCHER et al., 1974a; HILSCHER et al., 1976).

Im Gegensatz zu den Geschlechtszellen können bei den Stützzellen über den gesamten Zeitraum der Präspermatogenese hinweg Zellteilungen beobachtet werden. HILSCHER et al. (1972d) weisen darauf hin, daß die Proliferation wahrscheinlich nicht gleichmäßig, sondern schubweise in einzelnen Keimsträngen erfolgt. Um den 21. Fetaltag erreicht die Mitoseaktivität ihr Maximum. Am 1. Lebenstag fällt der Mitoseindex deutlich ab, bleibt dann aber konstant bis zum 5. Tag p.p. (HILSCHER et al., 1972b; LIPPERS, 1972). In den ersten Lebenstagen kommt es auch bei den Stützzellen zu vermehrten Zelldegenerationen (NOVI und SABA, 1968; HILSCHER und MAKOSKI, 1968).

Die Wandzellen zeigen ein den Stützzellen vergleichbares Proliferationsschema. Auch bei diesen Zellen liegen die Mitoseindices pränatal höher als nach der Geburt (EIGEL, 1974; LIPPERS, 1972).

Die Präspermatogenese endet mit dem Auftreten von Mitosen der T_2-Prospermatogonien (HILSCHER et al., 1974a; HILSCHER et al., 1976).

2.1.2 Die Spermatogenese der präpubertären Ratte

Die Spermatogenese beginnt mit dem Auftreten der ersten A-Spermatogonien (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968; NOVI und SABA, 1968; HILSCHER et al., 1972d; HILSCHER, 1974; HILSCHER und HILSCHER, 1976). Nach HILSCHER et al. (1972a) kann sie in die Spermatogenese der prä- und postpubertären Ratte unterteilt werden. Eine vergleichbare Unterscheidung wird in älteren Arbeiten von CLERMONT und PEREY (1957) und HILSCHER und MAKOSKI (1968) vorgenommen. Die frühe Spermatogenese ist durch Vorgänge gekennzeichnet, die zur Ausbildung und Ausreifung eines voll funktionsfähigen Germinativums führen. Dazu zählen der Beginn der Differenzierung von A-Spermatogonien, die auch Stammspermatogonien

genannt werden, in morphologisch reife Spermien, die Entstehung eines speziellen Stammspermatogonientyps, der die ständige Erneuerung des Keimepithels möglicht macht, und die Transformation der Stützzellen in Sertolizellen. (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968; HILSCHER et al., 1972a; HILSCHER, 1974; HILSCHER und HILSCHER, 1976.) Daneben kommt es zur Ausreifung des Interstitiums bzw. der Leydigzellen (ROOSEN-RUNGE und ANDERSON, 1959; NIEMI und KORMANO, 1964), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Beschreibungen über den Ablauf der frühen Spermatogenese liegen von mehreren Autoren vor (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968; HILSCHER und HILSCHER, 1976). Während die Angaben über die Entwicklung des Keimepithels und der Stützzellen weitgehend übereinstimmen, herrschen unterschiedliche Auffassungen über den genauen Zeitpunkt, zu dem die ersten A-Spermatogonien auftreten (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968; NOVI und SABA, 1968; ROOSEN-RUNGE und LEIK, 1968).

Neuere Untersuchungen über den Verlauf der späten Präspermatogenese und über den Beginn der frühen Spermatogenese stammen von HILSCHER et al. (1972d; 1974a), HILSCHER und HILSCHER (1976). Danach sind die ersten A-Spermatogonien am 6. Lebenstag zu beobachten. Einzelne dieser Zellen beginnen sich fast unmittelbar nach ihrer Entstehung zu differenzieren. Parallel dazu verläuft die Bildung des Stammzellreservoirs (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968; HILSCHER, 1974). Am 7. Lebenstag treten bereits die ersten Im-Spermatogonien (intermediäre Spermatogonien) auf, aus denen einen Tag später B-Spermatogonien und ruhende, das heißt präleptotäne Spermatozyten hervorgehen (HILSCHER und HILSCHER, 1976). Am 15. Tag p.n. (post natum) hat sich dann in fast allen Tubuli eine erste Spermatozytenschicht gebildet, pachytäne Formen treten auf

(CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968; HILSCHER und HILSCHER, 1976).

Welche Bedeutung diese erste Differenzierungswelle, eine Art Vorhut der Spermatogenese (HILSCHER und MAKOSKI, 1968) hat, ist nicht bekannt. HILSCHER und HILSCHER (1976) messen ihr keine wesentliche Rolle bei. Es entstehen bei diesen ersten Differenzierungsvorgängen wesentlich weniger Zellen als in späteren Stadien der Spermatogenese (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968). Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß die Entwicklung nur von wenigen Stammzellen ausgeht. Im Laufe der Differenzierung degeneriert außerdem der größte Teil dieser Zellen (CLERMONT und PEREY, 1957).

Ebenfalls um den 15. Tag p.n. tritt eine zweite, zahlenmäßig größere Zellgeneration von Im- und B-Spermatogonien sowie präleptotänen Spermatozyten auf (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968). 18 Tage p.n. sind in fast allen Tubuli zwei Zellgenerationen anzutreffen (CLERMONT und PEREY, 1957). Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Bildung des Stammzellreservoirs abgeschlossen (HILSCHER und MAKOSKI, 1968). Die Stützzellen haben ihre Mitoseaktivität eingestellt,und ihre Transformation in Sertolizellen beginnt (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968; STEINBERGER und STEINBERGER, 1971). Erste Reifeteilungen und junge Spermatiden treten zwischen dem 23. und 25. bzw. am 26. Lebenstag auf (HILSCHER und HILSCHER, 1976; HILSCHER und MAKOSKI, 1968; CLERMONT und PEREY, 1957). Am 35. Lebenstag beobachteten HILSCHER und MAKOSKI (1968) vereinzelt elongierte Spermatiden. Um den 45. bzw. 48. Lebenstag werden die ersten Spermien im Tubuluslumen angetroffen (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968). 48 - 60 Tage nach der Geburt soll das Keimepithel voll ausgebildet sein (HILSCHER und HILSCHER, 1976). Die Ratte wird um diese Zeit geschlechtsreif.

CLERMONT und PEREY (1957) haben sich als erste mit der Frage auseinandergesetzt, ob die Entwicklung des Keimepithels bei der präpubertären Ratte nach bestimmten Gesetzmäßigkeiten abläuft, und wenn, ob diese mit denen der Spermatogenese des adulten Tieres vergleichbar sind. Auf Grund ihrer histologischen Untersuchungen kamen sie zu der Auffassung, daß hier dieselben Prinzipien gelten wie für das adulte Tier. Die Ergebnisse von CLERMONT und PEREY (1957) konnten durch HILSCHER und MAKOSKI (1968) bestätigt werden. Danach können die verschiedenen Zellkombinationen von Spermatogonien, Spermatozyten und später auch Spermatiden schon sehr früh bestimmten Phasen des Keimepithelzyklus (nach LEBLOND und CLERMONT, 1952a) zugeordnet werden. Während CLERMONT und PEREY (1957) um den 15. bis 18. Lebenstag zwischen vier typischen Zellassoziationen unterscheiden, sprechen HILSCHER und MAKOSKI (1968) genauer von sechs verschiedenen Zellverbänden. Bei Tieren älter als 26 Tage können nach Angaben der oben zitierten Autoren alle Phasen des Keimepithelzyklus differenziert werden. Bei den ganz jungen Ratten kann die Tatsache, daß nur für den Keimepithelzyklus typische Zellkombinationen auftreten, als Beweis für eine bereits vorhandene Gesetzmäßigkeit angesehen werden.

HUCKINS (1965) berichtet, daß die Dauer der Spermatogenese der präpubertären Ratte kürzer ist als beim geschlechtsreifen Tier. Sie beträgt danach nur 42 Tage gegenüber 53 Tagen nach der Pubertät. Weiterhin haben die Untersuchungen ergeben, daß dies auf eine wesentlich raschere Differenzierung der Spermatogonien und Spermatozyten zurückzuführen ist, wogegen die Entwicklung der Spermatiden dieselbe Zeit in Anspruch nimmt wie beim adulten Tier. Auch HILSCHER und MAKOSKI (1968) sprechen von einer vergleichbar kürzeren Dauer der Spermatogenese bei der juvenilen Ratte. Keiner der Autoren konnte eine Erklärung für dieses Phänomen geben.

2.1.3 Die Spermatogenese der adulten Ratte

Die Spermatogenese des geschlechtsreifen Tieres ist gekennzeichnet durch eine kontinuierliche Erneuerung des Keimepithels, ausgehend von den Stammspermatogonien, sowie durch die dafür notwendige ständige Erneuerung des Stammzellpotentials (ROOSEN-RUNGE, 1962).

Die Spermatogenese beginnt mit dem Ende der Mitosen der A- oder Stammspermatogonien und endet mit der Spermiation, das heißt der Abgabe der morphologisch reifen Spermien in das Tubuluslumen. ROOSEN-RUNGE und GIESEL (1950) haben dafür auch den Begriff "Spermatogenesezyklus" verwendet.

Der Spermatogenesezyklus kann in drei große Abschnitte gegliedert werden, die nacheinander die Proliferation und Erneuerung der Stammzellen, die Reifung und zuletzt die Differenzierung der Geschlechtszellen umfassen (HILSCHER und HILSCHER, 1969; CLERMONT, 1972; HILSCHER, 1974; BUSTOS-OBREGON et al., 1975). Dies sind

- die Spermatogoniogenese
- die Spermatozytogenese und
- die Spermiogenese.

Im Rahmen der Spermatogoniogenese laufen zwei getrennte Prozesse ab. Neben der Proliferation der Spermatogonien erfolgt die Erneuerung des Stammzellpotentials (HILSCHER et al., 1969).
Während die Angaben in der Literatur über den Ablauf der Spermatogonienproliferation miteinander übereinstimmen, besteht noch große Unklarheit über ein Schema für die Erneuerung der Stammzellen. Keine der bisher vertretenen Theorien konnte eindeutig bewiesen werden.
Die Proliferation der Spermatogonien beginnt mit dem Ende

der A_1-Mitose und hört mit der Mitose der B-Spermatogonien auf (HILSCHER et al., 1969; HILSCHER und HILSCHER, 1969). Man unterscheidet heute zwischen sechs verschiedenen Spermatogonientypen, die in der Reihenfolge A_1-, A_2-, A_3-, A_4-,Im- und B-Spermatogonie hintereinandergeschaltet sind (CLERMONT, 1966; CLERMONT und BUSTOS-OBREGON, 1968; HILSCHER und HILSCHER, 1969; CLERMONT, 1972).
Im Laufe der Proliferation kommt es auch zu einer morphologisch sichtbaren Ausdifferenzierung der Zellen (CLERMONT, 1972). Während die A-Spermatogonien ihrem Aussehen nach als "dust-like" bezeichnet werden, beschreibt man die B-Spermatogonien als "crust-like". Sie ähneln in ihrem Aussehen bereits den präleptotänen Spermatozyten. Die Im-Spermatogonien nehmen im Aussehen eine Zwischenstellung ein, stehen funktionell aber den A-Spermatogonien näher (CLERMONT, 1972). Die Unterschiede im Erscheinungsbild sind bedingt durch eine Zunahme chromophiler Chromatinmassen, die vornehmlich in der Kernmembran konzentriert sind (CLERMONT, 1972).

Man ist sich heute auch darüber einig, daß neben dem proliferierenden Spermatogoniensystem noch eine weitere, undifferenzierte Spermatogonienart existiert, die durch eine erhöhte Strahlenresistenz gekennzeichnet ist (HILSCHER, 1964). Sie proliferiert unter physiologischen Umständen nicht, ihre Anzahl bleibt über einen Keimepithelzyklus hinweg konstant (DYM und CLERMONT, 1970). In der Literatur wird diese Spermatogonienart unterschiedlich als 0_1- (HILSCHER, 1964), A_0- (CLERMONT, 1962; 1966; 1972; CLERMONT und BUSTOS-OBREGON, 1968) und A_S- (HUCKINS, 1971a,b) Spermatogonie angesprochen.

Für das Erneuerungsmodell der Stammspermatogonien, das Gegegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen ist (CLERMONT und BUSTOS-OBREGON, 1968; CLERMONT, 1966; de ROOIJ und KRAMER, 1968; CLERMONT und HERMO, 1975; DYM und CLERMONT,

1970; HOCHEREAU-de REVIERS, 1976; CLERMONT und MAUGER, 1974, 1976: HUCKINS, 1971a,b; HILSCHER et al., 1969), gibt es mehrere Theorien. Auf diese soll jedoch an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Während der Spermatozytogenese kommt es zur Evolution der Spermatozyten I. und II. Ordnung (HILSCHER und HILSCHER, 1969), die auch primäre und sekundäre Spermatozyten genannt werden. Diese Phase der Entwicklung dauert vom Ende der Mitosen der letzten Spermatogoniengeneration bis zum Abschluß der 2. Reifeteilung. Sie führt zur Bildung von Geschlechtszellen mit haploidem Chromosomensatz.

Die Vorgänge während der Spermatozytogenese können nach zwei Gesichtspunkten betrachtet werden. Ist die Kinetik der Geschlechtszellen Gegenstand der Untersuchungen, so wird man die Generationszeit der Spermatozyten heranziehen. Dagegen ist für die Betrachtungen der Vorgänge im Rahmen der Reifeteilungen eine Gliederung in Prämeiose und Meiose sinnvoll (HILSCHER und HILSCHER, 1969).
Während der Prämeiose befinden sich die Geschlechtszellen in der Ruhephase oder besser im Präleptotän (TOBIAS, 1956). Am Ende des Präleptotäns treten die Geschlechtszellen zum letztenmal in die S-Phase ein (HILSCHER und HILSCHER, 1969). Es folgt die Prophase der 1. Reifeteilung. Diese wird untergliedert in ein Leptotän-, Zygotän-, Pachytän-, Diplotän- und ein Diakinesestadium. Die Prophase und hier speziell das Pachytän nimmt die meiste Zeit in Anspruch. Die restlichen Phasen laufen sehr rasch ab und entsprechen in ihrem Verlauf einer normalen Mitose. Die 2. Reifeteilung schließt sich unmittelbar an. Sie unterscheidet sich von einer normalen Mitose nur durch das Fehlen einer Synthesephase.

Unter dem Begriff Spermiogenese versteht man die Transformation der aus den Spermatozyten II. Ordnung entstandenen

Spermatiden in morphologisch ausgereifte Spermien.
Eine klassische Methode für die histologische Untersuchung und Unterscheidung der einzelnen Entwicklungsabschnitte ist die von LEBLOND und CLERMONT (1952b) modifizierte PAS-Färbetechnik nach HOTCHKISS (1948). Sie basiert auf der speziellen Anfärbbarkeit des Golgiapparates bei Spermatiden.

Spermatogonien reagieren nicht mit PAS, primäre und sekundäre Spermatozyten weisen nur ganz schwach anfärbbare Massen in der Nähe des Nucleus auf. Bei den Spermatiden nimmt die Färbbarkeit mit fortschreitender Differenzierung zu.

Auf Grund der Untersuchungen von LEBLOND und CLERMONT (1952a) kann die Spermiogenese bei der Ratte in vier Phasen mit insgesamt 19 eindeutig definierbaren Stadien gegliedert werden.
Dies sind:

	1. die Golgi-Phase	mit den Stadien	1 - 3,
	2. die Kopfkappen-Phase	" " "	4 - 7,
	3. die Akrosomen-Phase	" " "	8 - 14,
und	4. die Reifungs-Phase	" " "	15 - 19.

Eine genaue Beschreibung der morphologisch sichtbaren Veränderungen findet sich in den Arbeiten von LEBLOND und CLERMONT (1952b) und CLERMONT (1972).
Die neu entstandenen Spermatiden sind kleine, runde Zellen, bei denen nahe der Kernmembran, im Golgifeld liegend, eine sphärische Struktur beobachtet werden kann, die leicht PAS-positiv ist. Sie wird als Idiosom bezeichnet. Während der Golgiphase entwickelt sich daraus über mehrere sogenannte Proakrosomengranula ein einzelnes Akrosomengranulum. Gleichzeitig beginnt die Entwicklung des Flagellums, das heißt des Spermienschwanzes.

Während der nächsten beiden Phasen kommt es zur Ausbildung des Akrosoms, das zum Schluß kappenartig an der Spitze der Spermatiden sitzt. Im Laufe dieser Entwicklung orientiert sich der Kern mit dem Akrosomensystem in Richtung auf die Basalmembran. Es kommt zu einer zunehmenden Kondensation des Chromatins. Der Kern und mit ihm das Akrosomensystem werden länglich. In der letzten Phase, der Reifungsphase, haben die Spermatiden schon große Ähnlichkeit mit Spermien. Der Kern nimmt seine endgültige speziesspezifische Form an, ebenso das Flagellum. Abschließend werden die reifen Spermien in das Tubuluslumen abgegeben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Spermiation (FOUQUET, 1972). Damit ist die Spermatogenese bzw. ein Spermatogenesezyklus abgeschlossen.

Bei der Spermatogenese handelt es sich um einen kontinuierlichen Prozeß, der dazu führt, daß stets mehrere Generationen von Geschlechtszellen gleichzeitig an einem bestimmten Platz im Keimepithel vorhanden sind. Unter "Generation" sind Zellpopulationen zu verstehen, die sich auf derselben Entwicklungsstufe befinden, das heißt die etwa zum selben Zeitpunkt entstanden sind (CLERMONT, 1972). Die verschiedenen Zellgenerationen bilden miteinander eine bestimmte, speziesabhängige Zahl von definierbaren Zellassoziationen.

Bei der Ratte können nach dem klassischen Schema von LEBLOND und CLERMONT (1952a) 14 verschiedene Zellkombinationen unterschieden werden. Diese werden als Stadien (I - XIV) bezeichnet und ergeben aufeinanderfolgend den Keimepithelzyklus. Als Beurteilungskriterium für die Klassifizierung der Stadien wird die Entwicklung des Akrosoms, darstellbar mit der PAS-Technik, herangezogen (LEBLOND und CLERMONT, 1952a,b). Das Stadium I des Keimepithels ist dementsprechend durch das Auftreten neugebildeter Spermatiden gekennzeichnet. Hier stimmt also Stadium I des Keimepithelzyklus mit Stadium 1 der Spermiogenese überein.

Die Spermatogenese beginnt danach in Stadium IX und endet im Stadium VIII. Eine genaue Beschreibung der Stadien befindet sich in den Arbeiten von LEBLOND und CLERMONT (1952a,b), CLERMONT (1972) sowie HILSCHER und HILSCHER (1969) und HILSCHER et al. (1969).
Daneben gibt es zahlreiche weitere Modelle für die Klassifizierung der verschiedenen Zellassoziationen, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Die Dauer des Keimepithelzyklus, das heißt "die Zeit, welche die Keimzellen benötigen, um von der einen Keimzellschicht in die nächst höhere zu gelangen" (HILSCHER, 1964), und die Dauer der Spermatogenese wurden von mehreren Autoren mit Hilfe der Autoradiographie oder nach Röntgenbestrahlung bestimmt. Folgende Werte werden für die Dauer des Keimepithelzyklus angegeben: 12,0 Tage für die Sherman-Ratte (CLERMONT et al., 1959), 12,9 Tage für die Sprague-Dawley-Ratte (CLERMONT und HARVEY, 1965), 13,3 Tage (HUCKINS, 1965) bzw. 13,0 Tage und 12,8 Tage für die Wistar-Ratte (HILSCHER, 1964; HILSCHER und HILSCHER, 1969). Schon vorher war von ROOSEN-RUNGE (1951) der Versuch unternommen worden, die Keimepithelzyklusdauer mit histologischen Methoden zu bestimmen. Die errechneten Werte betrugen 16 Tage.

"Die Zyklusdauer bei der Ratte unterliegt nahezu keinen biologischen Schwankungen" (HILSCHER und HILSCHER, 1969). Sie ist konstant für einen bestimmten Stamm (HUCKINS, 1965; CLERMONT und TROTT, 1969) und weder durch Hypophysektomie (CLERMONT und HARVEY, 1965) und Gonadotropine (HUNTER, 1973), noch durch Geschlechtsbeanspruchung oder äußere Reize zum Beispiel Licht (ORTAVANT, 1958) zu beeinflussen. HILSCHER et al. (1973) berichten jedoch von einer Abnahme der Zyklusdauer mit zunehmendem Alter bei Ratten. So betrug der ermittelte Wert für 5 Monate alte Tiere 13 Tage und 4 Stunden, gegenüber 12 Tagen und 20 Stunden bei 26 Monate alten Ratten.

Die Dauer der Spermatogenese bzw. eines Spermatogenesezyklus beträgt 48 Tage (CLERMONT et al., 1959), 51,6 Tage (CLERMONT und HARVEY, 1965), 53,2 Tage (HUCKINS, 1965) bzw. ca. 52 Tage (HILSCHER, 1964; HILSCHER und HILSCHER, 1969), also das Vierfache der Keimepithelzyklusdauer. Genaue Angaben über die Kinetik der Spermatogenese finden sich bei HILSCHER et al. (1969) und bei HILSCHER und HILSCHER (1969) für die Wistar-Ratte, und zwar wird für die drei großen Abschnitte der Spermatogenese folgende Zeitdauer angegeben:

Spermatogoniogenese 8,6 Tage
Spermatozytogenese 20,4 Tage, davon fallen 20,2 Tage auf die Entwicklung der Spermatozyten I und nur 0,2 Tage, das sind ca. 6 Stunden, auf die Generationsdauer der Spermatozyten II
Spermiogenese 22,2 Tage.

Ähnliche Werte gibt auch HUCKINS (1965) mit 13,3, 17,2 und 22,7 Tagen für die einzelnen Abschnitte an.

Die Synchronisation im Aufbau der Spermatogenese, wie sie durch den Keimepithelzyklus zum Ausdruck gebracht wird, kann auch im Längsverlauf der Tubuli seminiferi über mehr oder weniger lange Strecken beobachtet werden (PEREY et al., 1961). Die einzelnen Abschnitte heißen hier nicht Stadien, sondern Segmente. Diese folgen einander kontinuierlich wie beim Ablauf des Keimepithelzyklus und werden in ihrer Gesamtheit als Spermatogeneseweile bezeichnet.

Welche Steuermechanismen dem Aufbau und Verlauf der Spermatogenese zugrunde liegen, ist bis heute nicht bekannt. Alle bisherigen Überlegungen haben mehr oder weniger hypothetischen Charakter. LEIDL (1968) sowie LEIDL und WASCHKE (1970) machen lokal-regionale Mechanismen, deren Wesen allerdings unbekannt ist, verantwortlich. Nach HILSCHER (1974) erfolgt die Anlage zum späteren Aufbau des Keim-

epithels bereits im Fetus. Dabei sollen Zellbrücken zwischen Gonozyten II bzw. Prospermatogonien eine entscheidende Rolle spielen. Daß derartige Plasmaverbindungen auch während der Spermatogenese des adulten Tieres zwischen Spermatogonien sowie Spermatozyten bestehen, konnte von FAWCETT (1970) gezeigt werden. Danach wäre die Synchronisation, zumindest zu einem bestimmten Teil, Ausdruck für das Abstammen von einer gemeinsamen Stammzelle. Nach einer anderen Theorie sollen die Sertolizellen, angeregt durch die Resorption der Residualkörperchen, regelmäßig am Ende eines Spermatogenesezyklus, zyklisch ein FSH-abhängiges "Sertolizellhormon" bilden (LACY, 1967). Dieses soll dann einen neuen Spermatogenesezyklus anregen. Diese Theorie erklärt aber keinesfalls die Entwicklung des Keimepithels, wie sie beim präpubertären Tier (CLERMONT und PEREY, 1957) oder bei der Ratte mit geschädigtem Keimepithel (HILSCHER et al., 1969) zu beobachten ist. Nach PEREY et al. (1967) sollen die Steuermechanismen entweder embryonal angelegt sein, was mit den Angaben von HILSCHER (1974) übereinstimmt, oder aber auf Interaktionen benachbarter Zellen beruhen. Die Interaktionen können durch stimulierende und oder hemmende Substanzen hervorgerufen werden. GILULA et al. (1976) weisen darauf hin, daß möglicherweise Verbindungen zwischen den Sertolizellen die strukturelle Basis für die Koordinierung der zyklischen Vorgänge darstellen.

Die Effektivität der Spermatogenese ist von vielen Faktoren abhängig, so von der Gesamtzahl der Stammspermatogonien, von der Anzahl der Spermatogoniengenerationen, die bis zur Entstehung von Spermatozyten I durchlaufen werden müssen, und vom jeweiligen Schema der Stammzellerneuerung (COUROT et al., 1970). Die maximale Produktion von Geschlechtszellen wird außerdem durch immer auftretende Zellverluste während der Spermatogenese begrenzt. Nach ROOSEN-RUNGE (1973) ist die Degeneration von Spermatogenesezellen als

ein normales Geschehen anzusehen, das von ihm als "negativer Selektionsmechanismus" bezeichnet wird. Der Grad und die Art der Degeneration sollen speziesabhängig und unter Umständen auch genetisch bedingt sein.

Welche Bedeutung die Degeneration für die Spermatogenese hat, ist noch nicht geklärt. Untersuchungen darüber wurden bisher für eine Reihe von Tieren, so für den Schafbock (ORTAVANT, 1958), für den Bullen (HOCHEREAU-de REVIERS, 1970) und für das Kaninchen (SWIESTRA und FOOT, 1963) sowie auch für den Menschen (BARR, MOORE und PAULSEN, 1971) durchgeführt.
Für die Ratte liegen Angaben von CLERMONT (1962) über einen Zellverlust während der Spermatogonienentwicklung vor. Auch ROOSEN-RUNGE (1955) berichtet von Zelldegenerationen während der Spermatogenese. Die Degenerationsrate soll insgesamt 22 % betragen. Die Zellen degenerieren phasenweise, allein oder in Gruppen.

2.1.4 Die Sertolizellen

Auf das Proliferationsschema der Stützzellen und ihre Transformation in Sertolizellen wurde bereits an anderer Stelle eingegangen (2.1.1 und 2.1.2).
Bei COUROT et al. (1970) findet sich ein umfassender Überblick über die bis dahin vorliegende Literatur. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß ein Zusammenhang zwischen der Funktion der Stütz- bzw. Sertolizellen und dem physiologischen Ablauf der Präspermatogenese und Spermatogenese sowie pathologischen Zuständen im Hoden besteht.
JOST (1972) diskutiert einen möglichen Einfluß der Stützzellen auf das Proliferationsschema männlicher Geschlechtszellen während der Präspermatogenese. Die Stützzellen sol-

len danach die Prospermatogonien daran hindern, ebenso wie die Oozyten beim weiblichen Tier in die Meiose einzutreten.
Über die Rolle der Stützzellen während der frühen Spermatogenese liegen keine Angaben vor.

Beim adulten Tier haben die Sertolizellen nach heutiger Auffassung mehrere wichtige Funktionen zu erfüllen, ohne die ein normaler Ablauf der spermatogenen Prozesse nicht möglich wäre. Neben ihrer Bedeutung für die Struktur der Tubuli seminiferi spielen sie eine ganz entscheidende Rolle durch die Bildung einer zweiten,inneren Blutgewebsschranke neben dem von den Wandzellen gebildeten äußeren "boundary tissue" (DYM und FAWCETT, 1970; FAWCETT, 1975; GILULA et al., 1976; RUSSEL, 1977). Ein Teil der Geschlechtszellen verliert dadurch den Kontakt mit der Basalmembran und entwickelt sich in einem Milieu weiter, das ausschließlich durch die Sertolizellen bestimmt wird. Weitere Funktionen sind der metabolische Stoffaustausch mit den Geschlechtszellen (TICE und BARNETT, 1963; ROOSEN-RUNGE, 1962), sowie ihre Beteiligung an der Koordinierung und Steuerung der Spermatogenese (LACY, 1967; DYM und FAWCETT, 1970; STEINBERGER, 1971; SCHULZE, 1974). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß die Sertolizellen als Bildungsstätte für Inhibin eine Feedback-Substanz für die FSH-Sekretion der Hypophyse, diskutiert werden (DAVIES et al., 1978). Zu erwähnen ist auch ihre Beteiligung an der Spermiation (FAWCETT und PHILLIPS, 1969; FOUQUET, 1972). Arbeiten von AUMÜLLER et al. (1975), SCHULZE et al. (1976) und STECKER und LLOYD (1978) weisen auf einen Zusammenhang zwischen Veränderungen oder Funktionsstörungen der Sertolizellen und pathologischen Zuständen im Hoden hin.

2.2 Steuerung und Beeinflussung der Spermatogenese

2.2.1 Hormonale Steuerung der Spermatogenese

Die Funktion der männlichen Gonade steht weitgehend unter dem Einfluß bzw. der Kontrolle von Gonadotropinen und Androgenen. Der Hauptvertreter der Androgene ist das Testosteron (HALL, 1970).
Die Bildung der Gonadotropine erfolgt im Hypophysenvorderlappen. Es sind geschlechtsunspezifische Proteohormone mit übergeordneter Funktion. Ihre Freisetzung wird vom Hypothalamus aus durch Releasing Hormone (RH) gesteuert (SCHALLY et al., 1972). Die für das männliche Tier wichtigen gonadotropen Hormone sind das FSH (= follicle stimulating hormone) und das LH (= luteinizing hormone), das auch als ICSH (= interstitial cell stimulating hormone) bezeichnet wird (HALL, 1970). Die Bedeutung der Gonadotropine ist aber noch nicht in allen Einzelheiten geklärt.

FSH stimuliert beim männlichen Tier das Tubuluswachstum (GRÄGEL, 1974; LEIDL et al., 1976) und beeinflußt sehr wahrscheinlich den Stoffwechsel (DAVIES, 1970) sowie die Sekretion der Sertolizellen (MURPHY, 1965). Nach LACY und PETTIT (1970) wird auch die Steroidhormonsynthese in den Sertolizellen durch FSH gesteuert. Nach neueren Untersuchungen von HANSSON et al. (1973, 1975) bewirkt das FSH die Bildung und Sekretion eines "androgen binding protein" (ABP) durch die Sertolizellen. Das ABP ist in der Lage, Testosteron spezifisch zu binden und bewirkt so eine Erhöhung der Steroidhormonkonzentration innerhalb der Tubuli seminiferi. Demnach kommt dem FSH eine Verstärkerfunktion für die Androgenwirkung am Keimepithel zu. Darüber hinaus wird auch ein direkter Einfluß auf die Spermatogenese diskutiert (MURPHY, 1965). Durch FSH allein kann jedoch weder eine Aufrechterhaltung der Spermatogenese noch eine vollständige Restitution des Keimepithels erreicht werden

(BÖRSCH, 1975; HANSSON et al., 1975). Auf die Feed back-Regulierung der FSH-Sekretion durch Inhibin wurde bereits bei den Sertolizellen hingewiesen.
In der präpubertären Ratte soll FSH die Leydigzellen für das LH sensibilisieren (ODELL et al.,1973).
LH führt zur Entfaltung der Leydigzellen und stimuliert diese zur Biosynthese von Androgenen (HALL, 1970). Ein direkter Einfluß auf das Keimepithel und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen soll nicht vorhanden sein (OKADA 1970; BÖRSCH, 1975).

Die Aufrechterhaltung einer physiologischen Spermatogenese und die Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen sind androgenabhängig (HALL, 1970; STEINBERGER, 1971). Dies soll jedoch nicht für alle Abschnitte der Spermatogenese in gleichem Maße gelten. So sind die Proliferation der Stammzellen und die Entwicklung der Spermatogonien bis zur Prophase der Spermatozyten I hormonunabhängig. Die Meiose und die weitere Entwicklung der Zellen zu reifen Spermien erfolgt jedoch nur in Gegenwart von Androgenen (LOHSTROH, 1976; STEINBERGER, 1971). STEINBERGER et al. (1964) konnten dies in einem in vitro-Versuch auch für das Hodengewebe 4 Tage alter, präpubertärer Ratten zeigen. Nach OKADA (1970) soll die Differenzierung der Gonozyten nicht hormonabhängig sein.

Die Wirkung der Gonadotropine und Androgene ist unter anderem abhängig vom Alter der Tiere. Junge Tiere reagieren empfindlicher als ältere. Außerdem sind speziesspezifische Unterschiede zu beobachten (HALL, 1970).
Eine Beeinflussung der quantitativen und qualitativen spermatogenen Prozesse beim adulten Tier ist unter physiologischen Bedingungen nicht möglich (CLERMONT und HARVEY, 1965; CLERMONT, 1972). BAHNER und SCHWARZ (1959) geben jedoch an, daß sie bei juvenilen Ratten durch Testosteronpropionat eine Pubertas präcox erzeugen konnten. Dabei

soll die Bildung von Spermatiden um ca. 2 Wochen vorverlegt worden sein.

2.2.2 Störungen der Spermatogenese durch spezifisch angreifende Noxen

Unspezifische Faktoren wie Allgemeinerkrankungen, Futterumstellung, traumatische Insulte, Toxine, chemische Substanzen oder psychischer Stress können zu einer Störung der Spermatogenese führen (ROBERTS, 1971; WIDMANN, 1974). Ihre Wirkungsweise ist häufig nicht genau abzuklären.

Daneben gibt es jedoch Noxen endogener oder exogener Herkunft, die spezifische Veränderungen am Hoden bzw. am Germinativum bewirken. Dazu gehören Röntgenstrahlen (OAKBERG, 1955; RUGH und SKAREDOFF, 1971), genetisch bedingte Störungen der Keimzellentwicklung, wie zum Beispiel durch Chromosomendefekte (KNUDSON, 1961), aber auch exogen zugeführte Hormone, zum Beispiel Testosteron, oder biologisch aktive Substanzen, wie die Prostaglandine (ERICSSON, 1972; ABBATIELLO et al.,1976), die zum Teil eine Hemmung der spermatogenen Prozesse hervorrufen können. Zu diesen spezifischen Noxen gehört auch die Schädigung durch Wärme.

2.2.2.1 Wärme als Noxe

MOORE und OSLUND (1923) sowie MOORE (1924) haben durch Untersuchungen an Schafen bzw. Ratten und Meerschweinchen gezeigt, daß für den physiologischen Ablauf der Spermatogenese eine optimale Temperatur im Hodengewebe, die niedriger liegt als die Körpertemperatur der einzelnen Spezies, Voraussetzung ist. Bestätigt wurde diese Theorie

durch Versuche von TURNER (1938), der zeigen konnte, daß intra-ocular homotransplantierte Hoden eine normale Spermatogenese aufweisen, solange die Temperaturverhältnisse denen im Skrotum entsprechen.
Angaben über die intratestikuläre Temperatur verschiedener Säuger und des Menschen finden sich in der Arbeit von WAITES (1970). Danach beträgt die Temperatur im Hoden der Ratte 32,9°C. Die physiologische Körpertemperatur dieser Spezies liegt bei 36,9°C.
Endogene wie exogene Ursachen können eine Störung der Wärmeregulierung bewirken. So kommt es bei abdominaler Lage des Testes (Kryptorchismus), Varicocoelen, lokalen Entzündungen und Hyperexie, aber auch bei starker Sonnenbestrahlung oder hoher Umgebungstemperatur zu einer Erhöhung der intratestikulären Temperatur.

Experimentell kann eine Wärmeschädigung der Gonaden durch artifiziellen Kryptorchismus (MOORE, 1924; CLEGG, 1963), durch künstlich erzeugtes Fieber (MacLEOD und HOTSCHKISS, 1941), oder durch Erwärmen der Gonaden mittels heißer Luft (WAITES und MOULE, 1961) oder warmen Wassers (EL AZAB, 1966; WIDMANN, 1974) hervorgerufen werden. Über die Auswirkungen einer lokalen Erwärmung der Hoden bestand lange Zeit Unklarheit, da die einzelnen Untersucher zu sehr unterschiedlichen, sich vielfach widersprechenden Ergebnissen kamen. Dies ist zu einem großen Teil darauf zurückzuführen, daß verschiedene Versuchsanordnungen gewählt wurden (Tierart, Dauer der Schädigung, Höhe der Temperatur, Parameter für die Versuchsauswertung), die einen direkten Vergleich der Ergebnisse nicht zuließen. In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, daß gewisse speziesspezifische Unterschiede zu beobachten sind. So soll beim Nager der Blutfluß bei Erhöhung der Temperatur ansteigen, während dies für andere Tierarten, zum Beispiel die Wiederkäuer (GLOVER, 1966) nicht beobachtet werden konnte. Daraus wird abgeleitet, daß es hier um so schneller zu einer Ischämie kommt (SETCHELL et al., 1966).

STEINBERGER und DIXON (1959) waren die ersten, die, am Modell der Ratte, systematisch die Zusammenhänge zwischen Höhe der gewählten Temperatur (41 - 45°C) und Intensität sowie Art der Schädigung untersucht haben. Die Dauer der Schädigung war konstant (15 Min.). Erstmals wurde auch die intratestikuläre Temperatur während der Versuche bestimmt. Ergänzt wurde diese Arbeit durch die Untersuchungen von CHOWDHURY und STEINBERGER (1964). Die Ergebnisse zeigen, daß ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Höhe der Temperatur, Intensität und Art der am Keimepithel auftretenden Defekte besteht. So wurden bei 43°C nachweisbare Veränderungen vorgefunden, bei 41°C konnte kein Effekt beobachtet werden, während es bei einer Temperatur von 45°C zu einer allgemeinen Zerstörung und Auflösung des Germinativums kam. Am empfindlichsten erwiesen sich die frühen und späten pachytänen Spermatozyten und die neu entstandenen Spermatiden in Stadium 1 und zu Beginn von Stadium 2 der Spermiogenese. Veränderungen an den Spermatogonien wurden nicht beobachtet. Die Untersucher kamen zu dem Schluß, daß bei "mittleren" Temperaturen - bei der hier gewählten Versuchsanordnung 43°C - spezifische Schäden am Keimepithel entstehen, wogegen hohe Temperaturen (hier 45°C) eine unspezifische Gewebszerstörung bewirken. Die ersten Anzeichen für eine erfolgte Schädigung konnten nach 4 Stunden (45°C) bzw. 2 Tagen (43°C) beobachtet werden. Charakteristisch sind die Bildung von Riesenzellen, das Auftreten von siegelringartigen Zellen und morphologisch sichtbare Veränderungen des Chromatins. Daneben findet man in den Tubuli Mengen von Detritus. Im Rahmen dieser Arbeiten konnte außerdem gezeigt werden, daß sich die Hodentemperatur erst langsam der Umgebungstemperatur anpaßt und somit die tatsächliche Erwärmungsdauer viel kürzer ist.

Eine detaillierte Arbeit über die Wirkung einer einmaligen Wärmeapplikation auf die Gonaden stammt von COLLINS und LACY (1969). Sie haben die Wirkung verschieden langer Er-

wärmungszeiten (10 - 30 Min.) bei gleichbleibender Temperatur (43°C) auf das Keimepithel der Ratte untersucht. Es wurde gezeigt, daß der Grad der Schädigung auch vom Zeitfaktor abhängig ist. Die Ergebnisse stimmen im großen mit denen von STEINBERGER und DIXON (1959) sowie CHOWDHURY und STEINBERGER (1964) überein. Allerdings kamen COLLINS und LACY (1969) zu der Überzeugung, daß die Schädigung des Keimepithels stets in Form spezifischer Verhaltensmuster erfolgt. Die Spermatogenesezellen sind unterschiedlich hitzeempfindlich bzw. -resistent und werden entsprechend früher oder später geschädigt. Als am empfindlichsten erwiesen sich die frühen und späten Spermatozyten und die neu entstandenen Spermatiden im Stadium 1 und zu Beginn von Stadium 2 der Spermiogenese, also Spermatiden der Golgi-Phase. Es folgen die präleptotänen, leptotänen und zygotänen Spermatozyten I, dann kommen die Spermatiden der Akrosomen- bzw. Kopfkappen-Phase. Die größte Resistenz besitzen die Spermatogonien und die Spermatiden der Reifungs-Phase.

Neben den hier erwähnten Arbeiten liegen noch eine Reihe weiterer, interessanter Untersuchungen vor. BAWA et al. (1971) haben gezeigt, daß nach einseitiger Hodenerwärmung die zweite Gonade vollständig unbeeinflußt bleibt und es sich somit nur um einen rein lokalen Effekt handeln kann. BOWLER (1967) hat die Dauer der sterilen Periode bei der Ratte nach einmaliger Schädigung mit ca. 60 Tagen angegeben. Er stützt sich dabei auf Reproduktionsversuche. Zu demselben Ergebnis waren STEINBERGER und DIXON (1959) auf Grund histologischer Untersuchungen gekommen. Arbeiten über die Auswirkungen wiederholter Wärmeapplikationen auf das Keimepithel stammen von VENKATECHALAN und RAMANATHAN (1962) sowie von BOWLER (1967, 1972). Auch nach mehrmaliger Schädigung kommt es zu einer Regeneration des Keimepithels, solange eine ausreichende Zahl von Stammspermatogonien erhalten bleibt. BOWLER (1972) berichtet

jedoch von einer Zunahme des Anteils irreversibel geschädigter Tubuli nach wiederholter Schädigung. Die Spermatogonien sollen während der Mitose gegen äußere Einflüsse empfindlich sein (DYM und FAWCETT, 1970). Die Dauer der Spermatogenese bleibt unbeeinflußt (BOWLER, 1967). Hormone sollen keinen Einfluß auf die Regeneration des Keimepithels haben (MAUSS, 1973).

Eine Schädigung der Sertoli- und Leydigzellen wurde von keinem der Autoren beobachtet. Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen blieben ebenfalls unbeeinflußt. Dasselbe gilt für die Libido und die Begattungsreflexe (COLLINS und LACY, 1969; BOWLER, 1967). COLLINS und LACY (1969) konnten auch bei in vitro Versuchen keinen Einfluß auf die Testosteronsynthese feststellen.
Im Gegensatz zu der Auffassung, daß die Wärmenoxe nur am Keimepithel angreift, stehen Beobachtungen von LLAURADO und DOMINGUEZ (1963) und HALL (1965). Sie sind der Meinung, daß auch die Androgenbiosynthese beeinflußt wird.

2.3 Das Kallikrein-Kinin-System

Bei experimentellen Untersuchungen über die postoperative reflektorische Anurie entdeckte 1925 der Chirurg E.K. Frey im Harn eine bis dahin unbekannte blutdrucksenkende Substanz, die sich durch ihre chemischen Eigenschaften von allen damals bekannten blutdruckwirksamen Stoffen, wie zum Beispiel Histamin, unterschied (FREY, 1926). Nach ihrem Entdecker wurde sie zuerst "FREY"- oder "F-Stoff" genannt. Die heutige Bezeichnung Kallikrein leitet sich von einem anderen griechischen Ausdruck für Pankreas ab, da angenommen wurde, daß der Ursprungsort des im Pankreas gebildeten Kallikreins mit dem des im Harn ausgeschiedenen Kallikreins identisch ist (KRAUT et al., 1930). Später wurden außer dem

im Pankreas gebildeten Kallikrein weitere Kallikreine in den Speicheldrüsen (WERLE und v. RODEN, 1936), in der Niere (de CARVALHO, 1971) und im Blutplasma (KRAUT et al., 1928) entdeckt.

WERLE (1937) fand eine inaktive Vorstufe des Pankreaskallikreins. Inaktive Vorstufen dieser Enzyme werden Präkallikreine genannt.
Ebenfalls 1937 stellten WERLE, GÖTZE und KEPPLER fest, daß nicht das Kallikrein selbst, sondern eine von ihm aus dem Blutplasma freigesetzte Substanz die bekannten Wirkungen wie Blutdrucksenkung, Erhöhung der Kapillarpermeabilität und Bronchokonstriktion hervorruft. Sie besitzt alle Eigenschaften, die vorher dem Kallikrein zugesprochen worden waren. Diese neue Substanz wurde Kallidin genannt. Sie wird von Organkallikreinen freigesetzt. ROCHAeSILVA et al. (1949) entdeckten später das Bradykinin, das von Plasmakallikrein freigesetzt wird. BOISSONNAS gelang es 1960, Bradykinin synthetisch herzustellen und so dessen Struktur aufzuklären. Die Strukturaufklärung für das Kallidin erfolgte 1962 (PLESS et al., 1962). Heute werden Substanzen mit ähnlichen Wirkungen wie Kallidin und Bradykinin unter dem Begriff "Kinine" zusammengefaßt. Ihre aktiven Vorstufen sind die Kininogene.

Inzwischen sind neben Kininasen, kininabbauenden Enzymen, auch Inhibitoren der Kallikreine entdeckt worden (WERLE, 1970).

Während man zu Beginn der Untersuchungen annahm, daß es sich beim Kallikrein um ein zirkulierendes Hormon handeln würde, weiß man heute, daß es ein Enzym ist, das nur eine Komponente eines komplexen Systems darstellt (Abb. 1).

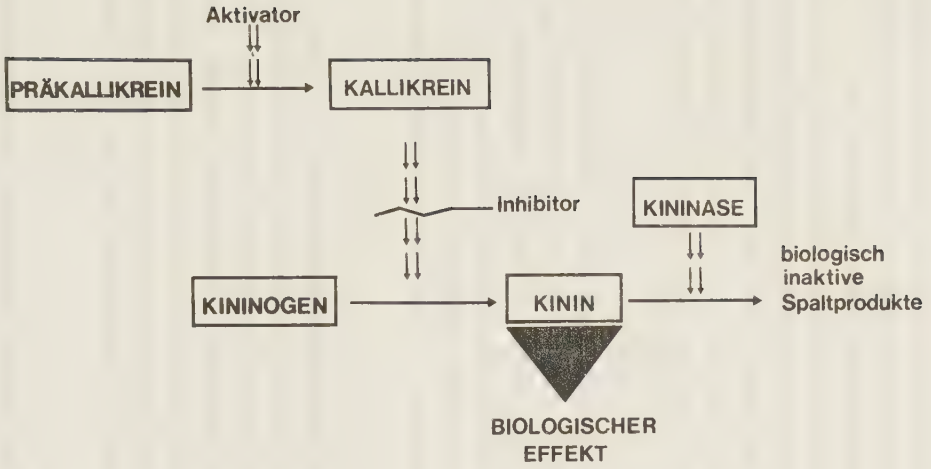

Abb. 1: Vereinfachtes Reaktionsschema des Kallikrein-Kinin-Systems (nach FREY et al., 1968)

2.3.1 Vorkommen und Bedeutung für den Organismus

Das Kallikrein-Kinin-System oder einzelne seiner Komponenten wurden nicht nur bei Säugern, sondern auch bei Vögeln, bei Reptilien in Schlangengiften, bei Amphibien in der Haut und in Insektengiften gefunden (FREY et al., 1968; ERDÖS, 1970). Am besten untersucht ist das Kallikrein-Kinin-System bei einigen Haussäugetieren, Labortieren und beim Menschen. Es kommt in allen bisher untersuchten Körperflüssigkeiten (zum Beispiel Blut-, Seminalplasma, Lymphe) und Organen (zum Beispiel Darm, Pankreas, Niere) vor (FREY et al., 1968; ERDÖS, 1970; WERLE, 1973).

Die Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems für physiologische Funktionsabläufe und/oder pathologische Prozesse im Organismus ist teilweise noch unklar. Während für die Organkallikreine unter natürlichen Verhältnissen ein lokaler Effekt am wahrscheinlichsten ist, kann das Plasmakallikrein unter Umständen auf den Gesamtorganismus einwirken.

Die hervorstechendsten pharmakologischen Wirkungen, die durch die Kinine im Versuch hervorgerufen werden, sind: Vasodilatation, Bronchokonstriktion, Erhöhung der Kapillarpermeabilität, Erregung der glatten Muskulatur und Schmerzerzeugung. Qualitativ dieselben Effekte werden in vivo auch durch Kallikreine bewirkt. Unterschiede sind rein quantitativer Natur. Sie lassen sich pharmakodynamisch durch die verzögerte Kininliberierung erklären (FREY et al., 1968).

FREY et al. (1968) rechnen das Kallikrein-Kinin-System zu den humoralen Regelmechanismen des Organismus. Ein direkter Nachweis für die Beteiligung des Systems bei einzelnen Prozessen im Organismus ist allerdings schwierig, da die Kinine sehr rasch durch die Kininasen zerstört werden. Die Halbwertszeit für Bradykinin im Kreislauf des

Menschen wird mit ca. 30 Sek. (SAAMELI und ESKES, 1962) angegeben. Aus diesem Grunde werden für Versuche wie für therapeutische Zwecke im allgemeinen Kallikreine anstelle von Kininen eingesetzt. Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß es sich hier nicht um ein System handelt, das isoliert für sich allein betrachtet werden kann, da es von anderen Regelmechanismen des Organismus direkt oder indirekt beeinflußt wird. Hierzu gehören das Blutgerinnungssystem (AUSTEN et al., 1972) und das Angiotensin-Renin-System der Niere (MARIN-GREZ und CARRETERO, 1973).

Als physiologische Funktionen nimmt man für Plasmakallikrein die Feedback-Aktivierung des Hageman-Faktors (FRITZ, 1975) und eine Beteiligung an der Regulierung des Gefäßtonus (ROTHSCHILD et al., 1976), für Pankreas- und Submandibulariskallikrein funktionelle Vasodilatation (FREY et al., 1968) und für Nierenkallikrein eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase an (CROXATTO, 1976).

Für eine Beteiligung an pathologischen Prozessen sprechen eine ganze Reihe von Versuchsergebnissen. So können durch Kallikreine bzw. Kinine alle Symptome einer Entzündung hervorgerufen werden (LEWIS, 1963; ROCHAeSILVA, 1963; STÜTTGEN, 1973). Es gibt auch Hinweise für eine Beteiligung bei Allergien und Schockzuständen (FREY et al., 1968). Kallikrein soll auch am Entstehen von Pankreatitiden (TRAUTSCHOLD et al.,1966; FORELL, 1963) beteiligt sein.

In den vergangenen Jahrzehnten lag das Hauptgewicht der Kallikrein-Kinin-Forschung auf dem vasodilatorischen und blutdrucksenkenden Effekt. Dasselbe gilt auch für den Einsatz von Kallikreinen in der Therapie. Sie wurden verabreicht zur Blutdrucksenkung, zur Erweiterung der Kapillaren oder zur Förderung von Wund- und Frakturheilungen.

Heute sind neue Aspekte einer möglichen Kallikrein- bzw. Kinin-Wirkung in den Vordergrund des Interesses getreten, unter anderem eine direkte Beteiligung an Stofftransport und Stoffaustausch, die Mitbeteiligung bei Zellteilungsprozessen (2.5) und die Bedeutung für die Reproduktion (2.6 und 2.7).

2.4 Kallikrein

Unter der Trivialbezeichnung "Kallikrein" (EC 3.4.4.21)* faßt man alle Enzyme zusammen, die die Eigenschaft besitzen, Kinine aus deren inaktiver Vorstufe, dem Kininogen, freizusetzen und sich von anderen kininliberierenden Enzymen wie Trypsin, Chymotrypsin, Akrosin oder Schlangengiften durch ihre strenge Substratspezifität unterscheiden. Mit Ausnahme einiger synthetischer Substrate spalten die Kallikreine nur Kininogen (FREY et al., 1968; ERDÖS, 1970). Sie benötigen keine Cofaktoren (FREY et al.,1968).

Die Kallikreine und die übrigen kininliberierenden Enzyme werden unter dem Begriff "Kininogenasen" zusammengefaßt (ERDÖS, 1970). Nach ihrer Lokalisation im Körper und auf Grund ihrer Eigenschaften wird zwischen Plasma- und Organkallikreinen unterschieden.

Ihrer chemischen Zusammensetzung nach handelt es sich bei den Kallikreinen nicht um reine Proteine, sondern um hochmolekulare Glukoproteine von unterschiedlichem Molekulargewicht und unterschiedlichem Kohlenhydratanteil. Als Kohlenhydratreste kommen hauptsächlich Glukosamin, Hexosen und Sialinsäure vor (FREY et al., 1968). Kallikreine sind säure- und hitzelabil. Bei Erwärmung auf 56°C für 30 Min.

---

* EC 3.4.4.21 = Kallikrein; Committee on Nomenclature of Hypotensive Peptides, 1965, Florenz

werden sie zerstört. Löslich sind die Kallikreine nur in Wasser, wäßrigem Alkohol und in Lösungen mit hoher Dielektrizitätskonstante, jedoch nicht in gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln wie zum Beispiel Äther (FREY et al., 1968).

Die Kallikreine werden zu der Gruppe der Endo- und Serinproteasen gezählt, da sie im Inneren des Substratmoleküls angreifen und im aktiven Zentrum einen Serinrest enthalten. Für das Schweinepankreas-Kallikrein ist bekannt, daß es, wie Trypsin, im aktiven Zentrum eine Asp-Ser-Glu-Gruppierung besitzt (FIEDLER et al., 1971). Die Spaltung des Substratmoleküls erfolgt durch die Hydrolyse der entsprechenden Aminosäureester (WERLE, 1973). Das Optimum der Spaltungsaktivität liegt im alkalischen Bereich bei pH 7 bis 8 (HABERMANN und BLENNEMANN, 1964).

Mit Ausnahme von Submandibulariskallikrein (WERLE und v. RODEN, 1936) liegt das Enzym fast ausschließlich als inaktive Vorstufe - Präkallikrein - vor (FREY et al., 1968; ERDÖS, 1970). Die Aktivierung der Präkallikreine erfolgt "in vivo" durch organeigene proteolytische Enzyme. Diese werden entsprechend als Präkallikreinasen bezeichnet. Dazu gehören unter anderem auch Trypsin, das Pankreaskallikrein freisetzt (WERLE, 1973) und der aktivierte Hageman-Faktor, der Plasmapräkallikrein umsetzt (AUSTEN, 1972).
Das natürliche Substrat der Kallikreine, das Kininogen, findet sich hauptsächlich im Blutplasma, aber auch in der Lymphe, im Samenplasma und fast allen anderen Körperflüssigkeiten. Es kommt in hoch- und niedermolekularer Form vor (FREY et al., 1968; ERDÖS, 1970). Die Kininogenkonzentration wird heute meistens in µg bzw. ng freisetzbarem Kinin pro ml Plasma oder pro mg Protein angegeben. Sie ist bei den einzelnen Tierarten sehr unterschiedlich, wie folgende Tabelle für Plasmakininogen zeigt.

Kininogengehalt im Plasma verschiedener Spezies, angegeben in µg freisetzbarem Bradykinin/ml Plasma

Spezies	µg Bradykinin
Mensch	10,6
Rind	14,5
Hund	6,0
Kaninchen	11,1
Ratte	2,0 (1,3 - 2,5)

Die Angaben stammen ursprünglich von DINIZ und CARVALHO (1963) und wurden in U Kininogen/ml Plasma* gemacht. FREY et al. (1968) geben sie umgerechnet in µg freisetzbarem Bradykinin/ml Plasma wieder.

Plasma- und Organkallikreine besitzen eine unterschiedliche Spaltungsspezifität. Während ersteres ein Substratmolekül wie Trypsin oder Schlangengift zwischen den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet und dabei Bradykinin freisetzt, greifen die Organkallikreine Methionyl-Lysyl-Bindungen an. Es entsteht Kallidin (FREY et al., 1968). Bradykinin und Kallidin sind die beiden wichtigsten freigesetzten Kinine. Sie werden auch als Kinin-9 (Nonapeptid) und Kinin-10 (Dekapeptid) bezeichnet.

Die einzelnen Kallikreine besitzen zum Teil sehr unterschiedliche Substratsspezifität, so daß sie nicht aus jedem Kininogen auch Kinin freizusetzen vermögen. Während zum Beispiel Plasmakallikreine nur hochmolekulares Kininogen aus Rinderplasma umsetzen, greifen die Organkallikreine nur das im selben Plasma vorkommende niedermolekulare Substrat an (FRITZ, 1975). Außerdem bestehen speziesspezifische Unterschiede (FREY et al., 1968).

---

* 1 U Kininogen = 1 Unit Kininogen = die Menge Kininogen, aus der 1 Einheit standardisiertes Bradykinin freigesetzt werden kann.

Synthetische Substrate, die von allen Kallikreinen gespalten werden, sind:

BAEE = Benzoyl-L-Arginin-äthylester
BAME = Benzoyl-L-Arginin-methylester
TAME = p-Toluolsulfonyl-L-Arginin-methylester
ATEE = N-Acetyl-L-Tyrosin-äthylester.

In ihrer Spaltungsgeschwindigkeit unterscheiden sich die einzelnen Kallikreine erheblich. So wird zwar BAEE von allen am schnellsten umgesetzt, jedoch spaltet Plasmakallikrein das Substrat 8 x schneller als Pankreaskallikrein. Es folgen Submandibularis- und Harnkallikrein (FREY et al., 1968).
BAEE wird auch für Aktivitätsbestimmungen, zum Beispiel im kombinierten BAEE/ADH-Test (BERGMEYER, 1974) verwendet (s. 3.1.6). Die Aktivität der Kallikreine wird entweder in biologischen (KE) oder in enzymatischen Einheiten (eKE) angegeben. Beide Einheiten sind nicht identisch (TRAUTSCHOLD und WERLE, 1961).

Im Gegensatz zu den oben genannten synthetischen Präparaten werden typische Substrate für Trypsin wie BANA (N-Benzyol-Arginin-naphthylamid) und BAPA (Benzoyl-Arginin-p-nitranilid) nur von Plasmakallikrein umgesetzt (FREY et al., 1968).
Die Kininfreisetzung durch Kallikrein kann durch natürlich vorkommende Inhibitoren, Antikörper, niedermolekulare Substanzen (Säuren, Basen, Oxidationsmittel) oder mit dem Kininogen konkurrierende Substrate reversibel oder irreversibel gehemmt werden (FREY et al., 1968; ERDÖS, 1970). Abgebaut werden die Kallikreine durch Proteasen (FREY et al., 1968).

2.4.1 Schweinepankreaskallikrein

Das Schweinepankreaskallikrein ist das heute am besten erforschte Kallikrein. Auf Grund verbesserter Methoden zur Reinigung und Isolierung dieses Enzyms (FRITZ et al., 1967; KUTZBACH und SCHMIDT-KASTNER, 1972) ist es möglich, genügend große Mengen mit entsprechend hoher biologischer bzw. enzymatischer Aktivität zu gewinnen, um es vermehrt für die Forschung und für therapeutische Zwecke einsetzen zu können.
HABERMANN (1962) hat als erster darauf hingewiesen, daß beim Schwein - im Gegensatz zu früheren Anschauungen - nach Abspaltung der für die Wirkung unwichtigen Sialinsäuren und einer Reihe von Reinigungsschritten zwei Formen des Pankreaskallikreins isoliert werden können, was später durch die Arbeiten von FRITZ et al. (1967), FIEDLER et al. (1967) und KUTZBACH und SCHMIDT-KASTNER (1972) bestätigt wurde.
Die beiden Kallikreine werden als Schweinepankreaskallikrein A und B bezeichnet. Kallikrein A erhielt seine Bezeichnung auf Grund der Tatsache, daß es bei der Elektrophorese die rascher zur Anode wandernde Fraktion darstellt (HABERMANN, 1962).
Untersuchungen von FIEDLER und WERLE (1967) und FIEDLER et al. (1970) deuten darauf hin, daß im Pankreas des Schweines entsprechend den beiden Kallikreinen A und B auch zwei Präkallikreine gebildet werden.

Angaben über den Aufbau des Schweinepankreaskallikreins liegen von FIEDLER et al. (1967; 1975; 1977) vor. Demnach handelt es sich um ein Glukoprotein, das in zwei Isoformen (A und B) vorkommt. Diese unterscheiden sich in ihrem Aufbau nur auf Grund ihres unterschiedlichen Kohlenhydratanteils. Die Proteinkomponente besteht aus 232 Aminosäuren. Die Aminosäuren sollen in Form von 2 Peptidketten angeordnet sein, die durch eine Disulfidbrücke miteinander ver-

bunden sind. Über den Aufbau des aktiven Zentrums ist bekannt, daß es eine Asp-Ser-Glu-Gruppierung besitzt (FIEDLER et al., 1971). Durch einen größeren Anteil der sauer reagierenden Aminosäuren Glu und Asp, verglichen mit den basischen Aminosäuren Lys und Arg (Verhältnis 61:17), ist das Enzym negativ geladen. Der Isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,4 (FRITZ et al., 1967). Die Anzahl der Aminosäuren, der Proteinaufbau und die Asp-Ser-Glu-Gruppierung im aktiven Zentrum lassen deutlich Ähnlichkeiten mit anderen Serinproteasen des Pankreas, wie zum Beispiel Trypsin, erkennen und weisen auf eine phylogenetische Verwandtschaft mit diesen Enzymen hin. Für den Proteinanteil errechnet sich ein durchschnittliches Molekulargewicht (MG) von 25 600. Das MG für das gesamte Schweinepankreaskallikreinmolekül wird für die A-Form mit 27 100 und für die B-Form mit 28 900 angegeben (FIEDLER et al., 1977). An Kohlenhydraten enthält das Schweinepankreaskallikrein Glukosamin, Mannose, Galaktose und Fucose sowie Spuren von Glukose (FIEDLER et al., 1967; 1975; 1977). Auf das Vorkommen von Sialinsäuren wurde schon oben hingewiesen. Während beim Schweinepankreaskallikrein A der Kohlenhydratanteil etwa 5,6 Gewichtsprozent beträgt, ist er bei der B-Form mit 11,5 Gewichtsprozent doppelt so hoch.
Die beiden Isoformen des Schweinepankreaskallikreins haben identische biologische (Blutdruck des Hundes) und enzymatische Eigenschaften (HABERMANN, 1962; KUTZBACH und SCHMIDT-KASTNER, 1972; FIEDLER, 1975; FRITZ, 1975).
In handelsüblichen Präparaten sind beide Formen enthalten.

2.4.2 Das Kallikrein-Kinin-System und die Zellteilung

PERRIS und WHITFIELD (1969), WHITFIELD et al. (1970a) sowie RIXON et al. (1971) haben als erste über die mitogene Wirkung von Bradykinin und Kallikrein bei Thymozyten und

Knochenmarkszellen in vivo wie in vitro berichtet. Der Effekt ist abhängig von extrazellulärem Calcium. Der intrazelluläre Mediator ist das cAMP (PERRIS und WHITFIELD, 1969). Der Effekt des Kinins entspricht dem des Vasopressin, Parat- und Wachstumshormons (MacMANUS et al., 1971a; WHITFIELD et al., 1970b; WHITFIELD et al., 1971).
Auf Grund ihrer mitogenen Wirkung werden die Kinine von PERRIS und WHITFIELD (1969), WHITFIELD et al. (1971), WHITFIELD et al. (1970a) und RIXON und WHITFIELD (1973) in die Gruppe der Wundhormone eingereiht. Als zellulärer Regelmechanismus sollen sie die Proliferationsaktivität der Zellen erhöhen und dadurch deren Regeneration initiieren.
ROHEN und PETERHOFF (1973) untersuchten die Wirkung von Schweinepankreaskallikrein auf das Darmepithel (Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon) von Ratten verschiedener Altersstufen. Eine Stimulierung der Mitoseaktivität konnte nach einmaliger intraabdominaler oder intraluminaler Injektion von 10 - 50 E Kallikrein, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, in den oberen Darmabschnitten (Duodenum, Jejunum) beobachtet werden. Die Mitoseaktivität erreichte ihr Maximum 4 - 6 Stunden nach der Behandlung. Dies stimmt mit den Angaben von PERRIS und WHITFIELD (1969) und WHITFIELD et al. (1970a) überein.
Kallikrein verabreicht in einer Dosierung von 100 E war ohne Wirkung. In einem weiteren Versuch wurde der Ductus pancreaticus experimentell unterbunden. 8 Tage danach konnte eine deutliche Hemmung der Mitoseaktivität in den Epithelien von Duodenum, Jejunum und Ileum beobachtet werden, die durch tägliche Injektionen von 30 E Kallikrein in den Magen aufgehoben werden konnte.

Weitere Untersuchungen an Thymozyten und Knochenmarkszellen unter in vitro-sowie in vivo-Bedingungen führten RIXON und WHITFIELD (1973) durch. Sie verwendeten für ihre Versuche Bradykinin und handelsübliches sowie hochgereinigtes Schweinepankreaskallikrein. Für die in vitro-Untersuchungen

verwendeten die Autoren Bradykinin in Konzentrationen von 1 - 4 µM. Schweinepankreaskallikrein wurde in Mengen von 1, 3, 5 und 10 E/100 g Ratte appliziert. Dabei wurde festgestellt, daß bereits 1 KE/100 g Ratte einen fast maximalen Effekt hervorruft, während Dosierungen von mehr als 5 KE weit weniger wirksam waren.
RIXON und WHITFIELD (1973) konnten auch nachweisen, daß Kallikrein selbst keine mitogenen Eigenschaften besitzt, da es sich in einem in vitro-Testsystem ohne Kininogenquelle als unwirksam erwies. Wenn auch in vivo große biologische und individuelle Schwankungen auftraten, so konnte doch stets eine Stimulierung der DNS-Synthese und der Mitoseaktivität beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von LÖBBECKE (1973). Mit Hilfe der Autoradiographie untersuchte er die Kurz- und Langzeiteffekte von hochgereinigtem Schweinepankreaskallikrein auf die DNS-Synthese in Thymozyten, Knochenmarkszellen, Darmepithelien des Duodenums und in Zungenepithelien. Er verwendete Kallikrein in Dosierungen von 1 bzw. 3, 10 und 100 E/100 g Ratte. Die Applikation erfolgte intramuskulär und oral, entweder als einmalige Gabe oder täglich über einen Zeitraum von 6 Wochen.
1 Stunde vor der Tötung wurde jedem Tier 1 µCi 3-H-Thymidin/g Körpergewicht verabreicht. Einen erhöhten Markierungsindex für das 3-H-Thymidin beobachtete der Autor nur nach Langzeitbehandlung von Zungenepithelien und Knochenmarkszellen.

GERICKE und CHANDRA (1969) hatten von einer Hemmung des Wachstums von Sarkomzellen durch extrazelluläres cAMP berichtet. LÖBBECKE (1973) konnte weder einen fördernden, noch einen hemmenden Einfluß von Kallikrein auf das Wachstum experimentell auf Mäuse übertragener EARAD-Leukämiezellen beobachten. KOPPELMANN et al. (1975) berichten von einer Hemmung des Tumorwachstums von SV-40-Hamster-Fibrosarkomen

nach längerer täglicher Injektion von 250 µg Bradykinin direkt in den Tumor. Die histologische Untersuchung der Tumoren zeigte eine Lymphozyteninfiltration und Nekrose des Gewebes bei den behandelten Tieren, jedoch nicht in der Kontrollgruppe.
LÖBBECKE (1973) folgert aus seinen Beobachtungen, daß Kallikrein keine mitogenen Eigenschaften besitzt. Die von ihm beobachteten Effekte sollen vielmehr auf eine Stimulierung von Zellen zurückzuführen sein, die normalerweise nicht zum sich teilenden Zellpotential gehören. Für die Stimulierung des Knochenmarks schließt er auch eine immunologische Reaktion auf das möglicherweise als potentes Antigen wirkende heterologe Kallikrein nicht aus.

Andere Untersuchungen, deren Ergebnisse ebenfalls zeigen, daß Kinine eine wichtige Rolle bei Zellteilungsprozessen bzw. als Wundhormone spielen, wurden von MASSART und RODESCH (1962), MANTZ et al. (1969) sowie MANDEL et al. (1973) durchgeführt. Sie konnten nach experimenteller Strahlenschädigung der Haut bei verschiedenen Tierarten durch Langzeitapplikation von Kallikrein eine deutliche Verkürzung der Heilungsphase erreichen. MANDEL et al. (1973) gibt die Dauer der Narbenbildung bei unbehandelten Ratten mit 92 Tagen gegenüber 58 Tagen bei den Versuchstieren an. Mit der Behandlung wurde hier beim Auftreten der ersten Ulzerationserscheinungen begonnen. Nach Ganzkörperbestrahlung (MANDEL et al., 1973) mit subletalen Dosen konnte die Überlebensrate erhöht werden. Das Knochenmark ließ eine beschleunigte Regeneration erkennen. Über einen positiven Effekt von Kallikrein auf proliferative Prozesse der Haut und des Unterhautbindegewebes wird auch von LANDLEITNER et al. (1974) und ERHARDT et al. (1974) berichtet. MASSART und RODESCH (1962) und MANTZ et al. (1969) deuten die Ergebnisse als Folge einer unspezifischen Stimulierung der Zellregeneration durch verbesserte Kapillardurchblutung, verbunden mit einem erhöhten Stoffangebot. In diesem Sinne

waren ursprünglich fast alle Ergebnisse gedeutet worden, die im Anschluß an eine Kallikreinbehandlung ein gesteigertes Zellwachstum oder eine verbesserte Wundheilung erkennen ließen. Dies ist nach heutigen Erkenntnissen aber wohl nur ein möglicher Mechanismus der Kallikreinwirkung, wie die Arbeiten von PERRIS und WHITFIELD (1969), WHITFIELD et al. (1970a), RIXON et al.(1971), ROHEN und PETERHOFF (1973) sowie RIXON und WHITFIELD (1973) und MANDEL et al.(1973) gezeigt haben.

Auf Grund der bisher vorliegenden Untersuchungen wird davon ausgegangen, daß die Kinine den Eintritt extrazellulärer Calcium-Ionen in die Zellmembran erleichtern. Calcium ist selbst in der Lage, in Konzentrationen ab 1,2 mM die DNS-Synthese zu stimulieren (MacMANUS und WHITFIELD, 1971; MacMANUS et al., 1971b; WHITFIELD et al., 1973). In Gegenwart von Bradykinin werden jedoch nur 0,6 mM Calcium benötigt. RIXON und WHITFIELD (1973) sprechen von einer Senkung des "saturation levels". In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß das Kinin die Zellen auch in völliger Abwesenheit von Calcium zu stimulieren vermag. Das Kinin muß also einen Rezeptor oder irgendeinen Teil der Zellmembran "programmieren". Die folgende Ereigniskette kann jedoch erst nach Zugabe von Calcium-Ionen ablaufen. Dies konnte auch für die in vivo-Verhältnisse anhand eines Versuches mit hypocalcämischen Ratten demonstriert werden. Bei diesen Tieren konnte keine Mitosestimulierung hervorgerufen werden (RIXON und WHITFIELD, 1973).
Calcium soll bei den hier geschilderten Vorgängen nicht die Adenylcyclase, die ATP in cAMP umbaut, stimulieren, sondern man nimmt an, daß es die Phosphodiesterase - das das cAMP abbauende Enzym - hemmt (MacManus und WHITFIELD, 1971; MacMANUS et al., 1971b). Dadurch wird die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöht.

Bei der Adenylcyclase wie bei der Phosphodiesterase handelt es sich um membrangebundene Enzyme mit ausgesprochenem Proteincharakter (MacMANUS und WHITFIELD, 1969b). Der genaue Mechanismus, der nun über das cAMP zur Stimulierung der DNS-Synthese führt, ist nicht bekannt. Man nimmt an, daß ein bestimmter Abschnitt in der Zellmembran stimuliert wird, der dann seinerseits die DNS-Synthese veranlaßt. Es ist möglich, daß es sich um denselben membrangebundenen Aktivator handelt, über den extrazelluläres cAMP, ohne in die Zelle einzudringen oder den intrazellulären Gehalt an cAMP zu verändern, in der Lage ist, die DNS-Synthese zu initiieren (MacMANUS et al., 1971a; WHITFIELD et al., 1972).
Durch Versuche mit Coffein bzw. Imidazol (RIXON und WHITFIELD, 1973; WHITFIELD et al., 1970a) konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem intrazellulären Mediator tatsächlich um das cAMP handeln muß. Coffein bedingt durch die Hemmung der Phosphodiesterase einen Anstieg des cAMP's. Imidazol dagegen stimuliert die Phosphodiesterase (ROBISON et al., 1971). Coffein allein hat in entsprechenden Konzentrationen ebenfalls mitogene Wirkung.
Coffein und Kinin zeigen, in nicht mitogenen Konzentrationen verwendet, eine synergistisch additive Wirkung (WHITFIELD et al., 1970a; RIXON und WHITFIELD, 1973). Imidazol ist in der Lage, die mitogene Wirkung von Coffein wie von Kinin zu hemmen (WHITFIELD et al., 1970a; RIXON und WHITFIELD, 1973).

2.4.3 Kallikrein und das Hypophysen-Gonaden-System

Über eine mögliche Beeinflussung des Hypophysen-Gonaden-Systems durch Kallikrein liegen nur vereinzelte Angaben vor.

FREY, HARTENBACH und SCHULTZ (1953) beobachteten bei Patienten nach Behandlung mit Depot-Padutin® *) als Nebeneffekt eine Beeinflussung der weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane. Bei Frauen kam es zu einer Regulierung von Oligo- und Dysmenorrhoen, in anderen Fällen zu einer Verstärkung der menstruellen Blutungen sowie gelegentlich zu einer Verkürzung des Zyklusintervalls. Männliche Patienten berichteten von einer Potenzsteigerung.

Eine Zunahme der eosinophilen Zellen im Hypophysenvorderlappen von Kaninchen, wie sie bei vermehrter Gonadotropinausschüttung zu sehen ist, wurde von HARTENBACH (1954) nach Kallikreinapplikation beobachtet.
Alle Untersucher führen diese Effekte auf eine verbesserte örtliche Durchblutung und eine damit verbundene unspezifische Aktivierung von Hypophyse und Nebenniere zurück. Eine selektive Beeinflussung von Organen oder einzelnen Zellsystemen wird von keinem der Autoren beschrieben. Eine indirekte, allgemeine Beeinflussung des Zellwachstums durch Kallikrein infolge verbesserter Durchblutung und ein dadurch bedingtes Mehrangebot von Baustoffen wird auch von FREY und HARTENBACH (1953) für andere Organe, zum Beispiel die Leber, beschrieben.
Ausführliche experimentelle Untersuchungen wurden von IGARASHI et al. (1962a) an Ratten durchgeführt. Männliche und weibliche geschlechtsreife oder prämature Tiere erhielten über einen Zeitraum von 30 bzw. 46 und 19 Tagen 0,1, 0,2, 1 oder 2 E Kallikrein bzw. Depot-Kallikrein pro Tier und Tag subcutan appliziert. Die Gewichte von Ovar, Uterus, Prostata und Samenblasendrüse nahmen im Vergleich zu den Kontrollgruppen stets signifikant zu, während Nebenniere, Schilddrüse, Hoden, Körpergewicht und Schwanzlänge gar nicht oder nur vereinzelt beeinflußt wurden. Die Gewichtszunahme von Prostata und Samenblasendrüse wird als Folge

---

*) Depot-Padutin® , Fa. Bayer - Leverkusen

einer gesteigerten Androgenproduktion angesehen.
Mit Hilfe des Mäuse-Uterus-Gewichtstests nach TAGAKI und KOBAYASHI (1958) wurde zusätzlich die Gonadotropinaktivität der Hypophyse juveniler männlicher und weiblicher Ratten bestimmt. Sie betrug bei den kallikreinbehandelten Tieren ungefähr das Doppelte. Die Schilddrüsenfunktion blieb dagegen mit einer Ausnahme unbeeinflußt.
Eine vermehrte Gonadotropinausscheidung im Harn von Frauen konnte von IGARASHI et al. (1962b) nach Dauertropfinfusion von 20 E Kallikrein nachgewiesen werden. Die Autoren nehmen an, daß Kallikrein an der Gonadotropinausschüttung beteiligt ist und es sich hier um einen weitgehend spezifischen Effekt handelt, da andere Hormone der Hypophyse unbeeinflußt blieben.
Die Ergebnisse von IGARASHI et al. (1962a) werden durch die Untersuchungen von WERLE et al. (1964) nur teilweise bestätigt. Die Versuche wurden in diesem Fall mit Padutin® *), gereinigtem Schweinepankreaskallikrein und Submaxillariskallikrein durchgeführt.
Weibliche und männliche Ratten verschiedener Altersstufen erhielten 4 Wochen lang täglich subcutan 1 E Kallikrein. Um weiterhin zu prüfen, ob etwaige Kallikreineffekte spezifischer oder unspezifischer Natur sind, wurde in einer der Versuchsreihen einer Gruppe männlicher Ratten auch Natriumacid appliziert. Natriumacid hat mit Kallikrein nur dessen Kreislaufwirkung gemein.
Ein positiver Kallikreineffekt konnte nur am Ende der Wachstumsperiode auf Körpergewicht und Schwanzlänge beobachtet werden. Eine statistisch signifikante Vergrößerung der Geschlechtsorgane mit Ausnahme der Prostata und der Samenblasendrüse oder eine Gewichtszunahme von Nebenniere, Hypophyse oder Schilddrüse wurde nicht nachgewiesen. Eine Beeinflussung der Gonadotropinaktivität der Hypophyse konnte

---

*) Padutin® , Bayer - Leverkusen

weder durch die verschiedenen Kallikreine noch durch Natriumacid hervorgerufen werden. Die Bestimmung erfolgte ebenfalls mit dem Mäuse-Uterus-Gewichtstest nach TAGAKI und KOBAYASHI (1958). Bei der histologischen Untersuchung der Schilddrüsen wurden nur bei den mit Natriumacid behandelten Tieren einer Versuchsreihe Anzeichen einer gesteigerten Funktion gefunden.
Die beobachteten Kallikreinwirkungen werden als unspezifisch angesehen, da dieselben Effekte auch durch Natriumacid hervorgerufen werden können.

2.4.4 Das Kallikrein-Kinin-System und die männliche Gonade

Angeregt durch die Beobachtungen, daß die Kinine in der Lage sind, die Zellproliferation und Zellregeneration einer Reihe von Geweben zu beeinflussen (s. 2.4.2), hat STÜTTGEN (1973) in einem Screening-Versuch als erster die Wirkung von Kallikrein auf die Ejakulatbeschaffenheit untersucht. Patienten mit Hyper-, Normo- und Oligozoospermie erhielten Kallikrein oral oder parenteral über einen Zeitraum von 2 bzw. 3 Wochen verabreicht. Bei Männern mit besonders gutem oder physiologischem Spermiogramm wurde eine zeitlich begrenzte Abnahme der Spermienzahlen beobachtet. Dagegen stieg diese bei Patienten mit Oligozoospermie deutlich an. Der Effekt war nicht auf die Dauer der Behandlung beschränkt, sondern blieb über Wochen bestehen. Mit dieser Arbeit gab STÜTTGEN den Anstoß für eine ganze Reihe experimenteller und klinischer Arbeiten, die sich mit dem Einfluß und der Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems für die Fortpflanzung beschäftigen.
Die Untersuchungen der letzten Jahre beim Menschen, aber auch beim Tier haben gezeigt, daß die für Kininfreisetzung wichtigen Komponenten sowohl in männlichen als auch in

weiblichen Genitalsekreten nachweisbar sind (FRITZ, 1975; PALM und FRITZ, 1975; BHOOLA et al., 1961; PALM et al., 1976; MORIWAKI et al., 1975; SCHILL et al., 1974c). Auch das Akrosin gehört in die Gruppe der Kininogenasen (FRITZ et al., 1973; PALM et al., 1976) und vermag in vitro Kinin, das heißt Bradykinin freizusetzen. Es wird diskutiert, ob dem Akrosin neben seiner Bedeutung für die Befruchtung der Eizelle eine weitere Funktion durch die Kininfreisetzung zukommt. PALM und FRITZ (1975), SCHILL (1975b) und WALLNER et al. (1975) konnten des weiteren zeigen, daß das Kallikrein-Kinin-System auch bei der Penetration und Migration von Humanspermien durch den Cervicalmucus eine Rolle spielt.

Die weitaus meisten Arbeiten beschäftigen sich mit der Wirkung von Kallikrein bzw. Kinin auf das Ejakulat. Ziel dieser Untersuchungen ist ein breiter therapeutischer Einsatz von Kallikrein in Fällen von Sub- und Infertilität, die mit bisherigen Methoden nicht oder nur unzureichend behoben werden konnten. Hierzu gehören hauptsächlich Fälle von Oligo- und Asthenozoospermie (SCHILL, 1975a; 1975b; 1975c; 1975d). Als Parameter für die Untersuchungen wurden die Spermienmotilität - sie gilt als Maßstab für das Befruchtungsvermögen (SCHILL und HABERLAND, 1974b) - die Dichte, die Gesamtspermienzahl, die Morphologie und der Stoffwechsel der Spermien herangezogen.
Die an Ejakulaten von Männern ohne Störung der Spermatogenese durchgeführten Untersuchungen von SCHILL und HABERLAND (1974a), SCHILL et al. (1974), SCHILL (1975e), LEIDL et al. (1975b) und PALM et al. (1976) haben gezeigt, daß durch die Zugabe von Kallikrein oder Kinin die Spermienmotilität in vitro deutlich stimuliert wird. Dies gilt gleichermaßen für pathologisch veränderte Ejakulate (SCHILL, 1975e; SCHIRREN, 1975). Der Effekt wird durch Zusatz von Serum als Kininogenquelle verstärkt bzw. durch Carboxypeptidase B,eine Kininase, und den Kallikreininhibitor Trasylol gehemmt (SCHILL et al., 1974).

Die besten Ergebnisse wurden erreicht mit Dosen von 1 KE/ml Sperma. Bei Verwendung höherer Dosierungen, bis zu 10 000 KE/ml, tritt ein Umkehreffekt ein, die Motilität wird herabgesetzt (SCHILL, 1975e; SCHILL et al., 1974).
Die Motilitätssteigerung ist in vitro bis zu 24 Stunden nachweisbar. Dieselbe Wirkung kann mit 0,5 - 1 ng Bradykinin (SCHILL und HABERLAND, 1974b; SCHILL et al., 1974) hervorgerufen werden.
Bei vergleichenden Untersuchungen an Bullensperma (LÄIDL et al., 1975a; PRINZEN, 1975) konnte eine entsprechende Motilitätssteigerung nur bei gewaschenen Spermien nach Zusatz von Kallikrein und Serum beobachtet werden. Die optimale Kallikrein-Dosierung betrug hier 100 KE/ml.
Im Rahmen zahlreicher klinischer Untersuchungen konnte bei Patienten mit Fertilitätsstörungen, besonders bei Asthenozoospermie, durch meist 7-wöchige parenterale (3 x 40 KE pro Woche), aber auch orale (3 x 2 Tabletten, entspricht 600 E pro Tag) Applikation von Kallikrein ebenfalls eine deutliche Motilitätssteigerung beobachtet werden. Sie bestand noch 3 - 5 Monate nach Behandlungsbeginn (STÜTTGEN 1973; SCHILL, 1975a, 1975b, 1975c, 1975d, 1975f, 1977; SCHIRREN et al., 1975; FROMANTIN et al., 1975; ISHIGAMI und KAMIDONO, 1975).
Bei Untersuchungen an Bullen mit normalen Spermabefunden wurden keine Motilitätssteigerungen beobachtet (LÄIDL et al., 1975a), jedoch erhöhte sich der Prozentsatz ungefärbter, das heißt lebender Zellen bei der Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau. MÜLLER und BRANDL (1977) berichten, daß bei drei von ihnen behandelten Problemstieren die Motilität nach Verdünnung der Ejakulate signifikant verbessert war, und daß das Sperma nach Tiefgefrierung einen höheren Anteil motiler Zellen und eine verbesserte mittlere Vorwärtsbewegung aufwies. Dieser Effekt konnte auch bei Untersuchungen an Hengstsperma beobachtet werden (SCHILL, 1977).
Beim Menschen konnte neben der Motilitätssteigerung nach parenteraler Applikation von Kallikrein zuerst ein Anstieg

der Dichte und später der Gesamtspermienzahl, speziell in Fällen von Oligozoospermie, beobachtet werden. Das Ejakulatvolumen soll dabei unverändert bleiben (SCHILL, 1975a). Dieser Effekt trat ca. 2, 3 - 5 Monate nach Behandlungsbeginn auf (SCHILL, 1975a; 1975c). SCHILL (1975c) berichtet von 28 % Konzeptionen nach der Behandlung von Patienten mit Oligozoospermie.

FROMANTIN et al. (1975) geben an, bei sieben Patienten mit Teratospermie durch die Anwendung von Kallikrein den Prozentsatz normaler Samenzellen von 78,2 auf 90,3 % verbessert zu haben.
Bei Bullen konnte eine Zunahme der Gesamtspermienzahl nicht beobachtet werden (LEIDL et al., 1975a), jedoch trat bei einem Bullen nach hohen Gaben von Kallikrein 2 - 3 Wochen nach Beginn der Behandlung ein deutlicher Abfall der Dichte auf. Eine Zunahme der Dichte bei gleichzeitig verringertem Ejakulatvolumen und gleichbleibenden Absolutwerten wurde bei drei Problemstieren beobachtet (MÜLLER und BRANDl, 1977).
Als weiteres Kriterium für eine stimulierende Wirkung von Kallikrein wurden die Fructolyse (SCHILL, 1975g) und der O_2-Verbrauch in vitro untersucht (SCHILL, 1975b; LEIDL et al., 1975b). Beide werden ebenfalls stimuliert.

Neben den hier erwähnten Arbeiten liegen nur wenige experimentelle Untersuchungen vor, die sich direkt mit der Wirkung des Kallikrein-Kinin-Systems auf die männliche Gonade befassen. Alle Arbeiten wurden an Ratten durchgeführt. MATTHIESSEN und ROHEN (1975) haben die Inkorporation von 3H-Thymidin nach experimenteller Pankreasnekrose und Gaben von Schweinepankreaskallikrein, 3 x 15 KE/100 g Ratte im Abstand von jeweils 24 Stunden, untersucht. Das 3H-Thymidin wurde 30 Mi-

nuten nach der letzten Kallikreingabe i.v. verabreicht. 90 Minuten später erfolgte die Tötung der Tiere. Die Autoren konnten eine statistisch signifikant erhöhte Aufnahme von markiertem Thymidin (darunter sind extra- und intrazelluläres 3H-Thymidin sowie das in die DNS eingebaute Material zu verstehen) nachweisen. Sie wird angegeben als relative spezifische Aktivität (dpm)/g Hodenfrischgewicht in Prozent. Ebenso war der Anteil 3H-Thymidin-markierter DNS bei den Versuchstieren signifikant erhöht. Ein signifikanter Anstieg des DNS-Gehaltes pro Gramm Hoden konnte nicht nachgewiesen werden. Die vorliegenden Ergebnisse werden im Sinne einer Stimulierung der DNS-Synthese interpretiert.

Die Arbeit von ROHEN und BUSCHHÜTER (1975) befaßt sich mit den morphologischen Veränderungen am Keimepithel nach Kallikreinapplikation. In zwei Versuchsreihen wurde bei allen Ratten eine einseitige Ductus deferens-Ligatur gesetzt. Danach erhielten die Tiere der Gruppe 1 jeden 3. Tag 50 E Kallikrein je Tier, über einen Zeitraum von 53 Tagen verabreicht. Die Ratten der Gruppe 2 erhielten 50 E/kg KG alle 2 Tage, über 2, 4, 6 und 8 Wochen i.p. appliziert. Ein Einfluß auf spermatogene Prozesse war nicht zu erkennen. Die karyometrischen Messungen bei den Sertolizellen ergaben jedoch eine signifikante Zunahme der Kernflächen (Versuch I) bzw. der Kernvolumina (Versuch II), letzteres jedoch nur an den Hoden,bei denen keine Ductus deferens-Ligatur gesetzt worden war. ROHEN und BUSCHHÜTER (1975) erklären die vorliegenden Ergebnisse mit einer Aktivierung des Zellstoffwechsels, die möglicherweise auf Veränderungen der Membranpermeabilität bei den Sertolizellen zurückgeführt werden kann. ROHEN und STUTTMANN (1977) konnten nach Applikation von 100 Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht, täglich intraperitoneal, vom 1. bis 20. Lebenstag keinen Einfluß auf die Anzahl von Geschlechts- und Stützzellen in den Tubuli feststellen. Sie beobachteten aber, daß A-Spermatogonien bei den behandelten Tieren schon 1 bis 2 Tage früher auftraten

als bei den Kontrolltieren und schließen daraus auf eine Vorverlegung des Beginns der Spermatogenese.

Zusammenfassend kann auf Grund der bisher vorliegenden Untersuchungen gesagt werden, daß Kallikrein in der Lage ist, die Spermatogenese, sei es direkt oder indirekt, und die Motilität der Spermien, speziell in Fällen von Oligo- und Asthenozoospermie oder bei abnormen morphologischen Befunden beim Menschen, zu stimulieren. Auch ist bekannt, daß die eigentlich wirksame Substanz nicht das Kallikrein, sondern das von ihm freigesetzte Kinin ist.
Unbekannt ist aber bis jetzt noch der Angriffspunkt des Kallikrein bzw. der Kinine und ihr Wirkungsmechanismus. Auch die zuletzt erwähnten Arbeiten lassen nur bedingt Schlüsse zu, da die Untersuchungen nur an Ratten und nur an Organen mit ungestörter Spermatogenese durchgeführt wurden.
Als mögliche Angriffspunkte für die Kinine am Hoden werden die Sertolizellen und frühe Entwicklungsstufen der Keimzellen, wie Stammzellen oder sich differenzierende Spermatogonien, diskutiert (ROHEN und BUSCHHÜTER, 1975; SCHILL, 1975c).
Für die Stimulierung der Motilität und den Einfluß auf die Spermatogenese, in vitro und in vivo, werden folgende Wirkungsmechanismen von SCHILL (1975e), LEIDL et al. (1975b), SCHILL und HABERLAND (1974b), SCHILL et al. (1974), SCHILL (1975a), FRITZ (1978), ISHIGAMI und KAMIDONO (1975), PALM et al. (1976), MATTHIESSEN und ROHEN (1975) und BUSCHHÜTER und ROHEN (1975) diskutiert:

1) Veränderung der Zellmembranpermeabilität,

2) Beeinflussung membrangebundener Transportmechanismen,

3) direktes Eingreifen in intrazelluläre Prozesse wie zum Beispiel die DNS-Synthese, eventuell über das

cAMP und das Adenylcyclase-System oder auch über eine Induzierung der Prostaglandinsynthese, wie sie PALM et al. (1976) in ihrem Schema für die Motilitätssteigerung der Spermien (Abb. 2) wiedergeben,

4) zusätzliche Verbesserung der örtlichen Durchblutungsverhältnisse und ein daraus resultierendes Mehrangebot stoffwechselwichtiger Substrate.

Wie schon oben erwähnt, findet sich bei PALM et al. (1976) ein Schema für die Vorgänge, die zur Motilitätssteigerung der Spermien führen sollen. Demnach verläuft die Ereigniskette über eine Stimulierung der Prostaglandinbiosynthese und dann über das Adenylcyclase-System und schließlich über das cAMP.
Untersuchungen über die Wirkung von Coffein auf die Motilität von Spermien zeigten vergleichbare Ergebnisse wie nach Kallikreingaben (COCHETT et al., 1976; HOMMONAI et al., 1976; SCHILL, 1975h). Coffein hemmt die Phosphodiesterase, also das Enzym, das das cAMP abbaut.
Vergleichende Untersuchungen mit Kallikrein und Coffein ergaben eine Potenzierung der Wirkung (SCHILL, 1975h).
Dieser Weg der Kallikreinwirkung könnte dem für die Zellproliferation und -regeneration besprochenen Mechanismus entsprechen (2.4.2).
Daß Bradykinin Prostaglandine freisetzen kann, ist bekannt (DAMAS und DEBY, 1974), ebenso wie die Tatsache, daß der Bradykinineffekt auf die Kapillarpermeabilität durch Prostaglandine potenziert wird (IKEDA et al., 1975).
LUPULESCU (1975) beobachtete einen verstärkten Einbau von 3H-Thymidin in DNS.
BYGDEMA et al. (1970) geben an, daß im Seminalplasma fertiler Männer ca. 60 µg Prostaglandin E/ml enthalten sind. Andererseits stellten sie fest, daß bei infantilen Patienten ohne manifeste Sterilitätsursache die PG_E-Spiegel nur

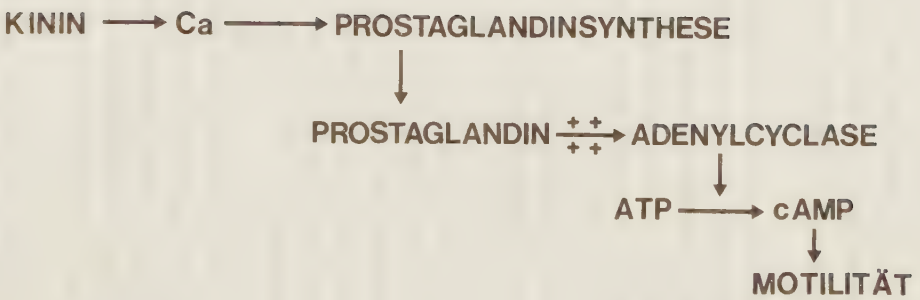

Abb. 2: Reaktionsschema für die Stimulierung der Spermienmotilität durch Kinin (PALM et al., 1975)

ca. 20 µg/ml betrugen.
Ob möglicherweise auch der spermatogenesestimulierende Effekt über die Prostaglandinsynthese verläuft, wäre zu diskutieren.
BÖTTGER und FUNCKE (1978) konnten zeigen, daß die Stimulierung des Unterarmstoffwechsels durch Bradykinin über endogen synthetisiertes Prostaglandin verläuft. Der Effekt ist durch Indometazin hemmbar.
Untersuchungen über die Wirkung von $PGF_{2\alpha}$, $PGF_{1\alpha}$, PGE_1 und PGE_2 auf die Spermatogenese deuten aber auf eine hemmende Wirkung dieser Prostaglandine hin (ABBATIELLO et al., 1976). Dagegen konnte nach Gaben von Aspirin, einem Prostaglandininhibitor, die Fertilität deutlich verbessert werden (RAMOS, 1975).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methode

3.1.1 Versuchstiere

Alle Untersuchungen wurden an Sprague-Dawley- oder Wistarratten durchgeführt. Die Aufzucht junger Tiere bis zum 20. Lebenstag erfolgte durch Ammenmütter. Ältere Ratten wurden in Einzelkäfigen gehalten. Alle Tiere waren denselben standardisierten Umweltbedingungen ausgesetzt. Die Nahrung bestand aus pelletiertem Futter (HERILAN R/M) und Wasser, beides ad libitum. Die Raumtemperatur betrug 23 - 24°C, die relative Luftfeuchtigkeit 40 - 60 Vol.%. Die Helligkeitsperiode dauerte 14 Stunden täglich.

Die Versuchstiere wurden den einzelnen Gruppen einer Versuchsreihe stets so zugeordnet, daß die durchschnittlichen Körpergewichte der Gruppen so wenig wie möglich differierten. Eine Ausnahme wurde nur bei Ratten gemacht, die unmittelbar post natum in den Versuch genommen wurden. Hier mußte die Zuordnung aus technischen Gründen zufällig vorgenommen werden. Um aber Wurfeinflüsse möglichst zu vermeiden, wurden nur Tiere aus Würfen mit nicht mehr als 10 Jungen herangezogen. Wurfgeschwister wurden auf verschiedene Versuchsgruppen verteilt. Bei den Experimenten mit 1 und 5 Tage alten Ratten wurden die Tiere einer Versuchsgruppe außerdem gleichmäßig auf alle Ammenmütter verteilt.

3.1.2 Kallikrein

Für die Versuche wurde ein Kallikrein-Versuchspräparat mit der Bezeichnung "Bay d 7687"*) oder hochgereinigtes Schweinepankreaskallikrein**) mit einer Aktivität von 1290 oder 1180 KE/mg organische Substanz benutzt. Die Dosierung wurde stets bezogen auf kg Körpergewicht (KE/kg KG) angegeben und in 5-tägigen Intervallen dem jeweiligen zu erwartenden durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere angepaßt. Als Lösungsmittel und als Placebo diente sterile physiologische Kochsalzlösung (0,9 %ig) mit einem pH von 7,0 bis 7,2. Das Lösungsmittelvolumen war immer konstant (0,05 ml vom 1. bis 4. Lebenstag, 0,1 ml ab 5. Lebenstag). Es wurden nur Lösungen verwendet, die vor nicht mehr als 5, in Ausnahmefällen 10 Tagen hergestellt worden waren. Die Lösungen wurden im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt.

Zu Beginn und am Ende eines jeden Versuches sowie jeden 5. Tag wurden die Tiere gewogen.

---

*) "Kallikrein" (Bay d 7687), Fa. Bayer, Leverkusen (40 E/Ampulle)

**) Das Versuchspräparat "Kallikrein" Bay d 7687 und das hochgereinigte Schweinepankreaskallikrein wurden dankenswerterweise von der Firma Bayer AG, Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Behandlungsmodelle

3.1.3.1 Einmalige Kallikreinapplikation bei präpubertären Tieren

Untersucht wurde der Einfluß einer einmaligen intraperitonealen Applikation von hochgereinigtem Schweinepankreaskallikrein auf die Spermatogenese der präpubertären Ratte während des Übergangsstadiums von der Präspermatogenese zur Spermatogenese. 50 Wistarratten wurden im Alter von 4 Tagen auf 10 Gruppen (A - K) zu je 5 Tieren verteilt. Die Ratten der Gruppe K dienten als Kontrolle. 96 Stunden (= 4,0 Tage), 119 Stunden und 120 Stunden nach der Geburt erhielten sie eine einmalige Injektion von 1, 10 oder 100 E Kallikrein/kg KG. Von den Kontrolltieren erhielten je 2 Tiere physiologische Kochsalzlösung 96 und 119 Stunden und 1 Tier 120 Stunden p.n. Im Ergebnisteil werden die Werte dieser Tiere immer als die Werte einer Gruppe angegeben.
Alle Tiere erhielten 120 Stunden p.n. 3H-Thymidin*) i.p. verabreicht. Die Dosierung betrug 2 µCi/g Ratte, gelöst in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung. Eine Stunde später wurden alle Tiere getötet.

*) Verwendet wurde Methyl-3-H Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 3000 mCi/mM, Amersham-Buchler, Braunschweig

3.1.3.2 Langzeitmedikation bei präpubertären Ratten

Im Rahmen dieser Versuche wurde der Effekt wiederholter Kallikreingaben auf die Entwicklung des Keimepithels und der Sertolizellen untersucht. Um möglichst alle Vorgänge am Keimepithel erfassen zu können, wurden drei Versuchsanordnungen mit Variationen bezüglich Beginn und Zeitdauer der Kallikreinapplikation, Dosierung und Applikationsmodus verwendet.

Im ersten Versuch standen 32 männliche Sprague-Dawley-Ratten zur Verfügung. Sie wurden zu je 8 Tieren auf 4 Gruppen, das heißt eine Kontrollgruppe und 3 Behandlungsgruppen, verteilt.
Die Tiere erhielten über einen Zeitraum von 15 Tagen (5. bis 20. Lebenstag) einmal täglich das Kallikrein-versuchspräparat Bay d 7687 in Dosierungen von 1, 5 und 10 E/kg KG s.c. appliziert. Alle Tiere wurden am 35. Lebenstag getötet.

Im folgenden Experiment wurden die Untersuchungen mit hochgereinigtem Schweinepankreaskallikrein leicht modifiziert durchgeführt. 75 prämature männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden auf 5 Gruppen von je 15 Tieren verteilt. Eine Gruppe diente als Kontrolle. Hochgereinigtes Schweinepankreaskallikrein wurde in Dosierungen von 1, 5, 10 oder 100 E/kg Körpergewicht 1 x täglich vom 5. bis 20. Lebenstag s.c. verabreicht.
Die jeweils 5 bzw. 4 leichtesten Tiere einer Gruppe wurden am 20. Lebenstag, also unmittelbar nach Abschluß der Behandlung, getötet.(In 2 Gruppen war je eine Ratte gestorben.) Die Tötung der restlichen Tiere (10 pro Gruppe) erfolgte am 35. Lebenstag.

Im dritten Versuch wurde der Beginn der Behandlung auf den ersten Lebenstag verlegt, um die postnatale Präspermatogenese mit zu erfassen. 90 neugeborene Wistarratten standen für diesen Versuch zur Verfügung. Je 30 Tiere wurden vom 1. bis 20., 1. bis 25. oder 1. bis 35. Lebenstag behandelt. Jeweils 10 Tiere erhielten physiologische Kochsalzlösung oder 100 bzw. 1000 E Kallikrein/kg KG täglich i.p. appliziert.
Die Tiere wurden am Ende der Behandlungsperioden getötet.

3.1.3.3 Langzeitmedikation bei adulten Ratten mit experimentell geschädigter Spermatogenese

In diesem Versuch wurde der Einfluß von hochgereinigtem Schweinepankreaskallikrein auf die Regeneration des experimentell geschädigten Keimepithels der postpubertären Ratte untersucht.
Für die Untersuchungen standen 56 geschlechtsreife männliche Wistarratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 270 g zur Verfügung. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere etwa 70 - 80 Tage alt. Die Durchführung des Versuches erfolgte in drei Abschnitten:
a) experimentelle Hodenschädigung
b) Behandlungsphase und
c) Reproduktionsversuch.

a) Hodenschädigung

Durch kurzfristige, lokale Erwärmung von Skrotum und Hoden wurde ein selektiver Spermatogeneseschaden erzeugt. Die Schadeinwirkung erfolgte in Narkose. Die gewählte Dosierung von 40 mg Narcoren® /kg KG*) war ausreichend für eine Schlafdauer von 30 Minuten. Bis zum Narkoseeintritt vergingen ca. 3 - 5 Minuten, die Erholungsphase dauerte 1,5 bis 3 Stunden. Komplikationen wurden nicht beobachtet.
Die Erwärmung der Hoden wurde im Wasserbad bei 43,0 $\pm$ 0,2°C für 20 Minuten, in Anlehnung an die Untersuchungen von COLLINS und LACY (1969) vorgenommen. Als Wasserbad diente ein ULTRA-Thermostat NBS 59068 mit automatischer Temperaturregulierung. Zusätzlich wurde die Temperatur während des gesamten Versuches mit einem Quecksilberthermometer kontrolliert.

---

*) Narcoren® , Fa. Iffa Merieux GmbH

Die Tiere wurden so fixiert, daß außer dem Skrotum mit den Hoden nur noch der Schwanz der Ratten miterwärmt wurde. Die extraabdominale Lage der Hoden wurde während des Erwärmungsprozesses überprüft.
Die hier beschriebene Versuchsanordnung war in einem Vorversuch an 10 Tieren überprüft worden. Die Intensität der Noxe wurde so gewählt, daß es zu keiner irreversiblen Schädigung des Keimepithels kam.

b) Behandlungsphase

Einen Tag nach der Hodenerwärmung (= Versuchstag 1) wurde mit der Behandlung der Tiere begonnen.
Die Häfte der Ratten, das heißt 28 Tiere, erhielten täglich 100 E Kallikrein/kg Körpergewicht i.p. von Versuchstag 1 bis 42 appliziert. Die restlichen 28 Tiere dienten als Kontrolle. Sie erhielten physiologische Kochsalzlösung.Zur Überprüfung der Intensität der Hodenschädigung und der Regenerationsprozesse wurden am 7. und am 21. Tag nach Einwirken der Noxe 4 bzw. 12 Ratten pro Gruppe getötet. Es handelte sich jeweils um die Tiere mit den leichtesten Körpergewichten.

c) Reproduktionsversuch

Gleichzeitig mit dem Ende der Behandlungsphase wurden die Rattenmännchen mit je einem Weibchen verpaart. Es sollte geprüft werden, ob und wann die Männchen wieder fertil werden würden. Die hier verwendeten Weibchen hatten alle schon einmal geworfen. Durch 30- bis 60-minütiges Überwachen der Tiere während mehrerer Tage wurde ihr Sexualverhalten beobachtet.
Am 104. Tag nach der Schädigung, das entspricht zwei vollen Spermatogenesezyklen (HILSCHER und HILSCHER, 1969), wurden

alle männlichen Tiere getötet.
Weibchen, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht geworfen hatten und auch keine Anzeichen für eine Trächtigkeit (Körperform, Gewichtszunahme) erkennen ließen, wurden 21 Tage später mit fertilen Männchen gepaart und dann auf Implantationsstellen untersucht.

3.1.4 Tötung der Tiere und Aufarbeiten der Organe

Unmittelbar nach Tötung der Tiere in Äthernarkose durch Zervikaldislokation wurden die Organe - Hoden, Nebenhoden und Samenblasendrüsen - entnommen, freipräpariert und gewogen. Die Samenblasendrüsen wurden vor dem Wiegen zwischen Papiertüchern sorgfältig ausgedrückt, um Gewichtsschwankungen durch einen unterschiedlichen Füllungszustand zu vermeiden. In den Tabellen wird immer das Gesamtgewicht der paarigen Organe angegeben, das auch in die statistischen Berechnungen einging. Beide Hoden wurden anschließend in Bouin fixiert.
Die Präparate wurden routinemäßig entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden ca. 5 µ dicke Schnitte angefertigt und mit Hämalaun-Eosin gefärbt.
Von den Hoden der 5 Tage alten Ratten, die eine einmalige Applikation von Kallikrein sowie 3H-Thymidin erhalten hatten, wurden außerdem Autoradiogramme hergestellt.
Die Anfertigung der Autoradiogramme (nach Dipping-Methode) erfolgte im Institut für Lufthygiene und Silikoseforschung in Düsseldorf nach folgendem Schema:
Von beiden Hoden wurden etwa 5 µ dicke Schnitte hergestellt, in Xylol entparaffiniert und dann über die ansteigende Alkoholreihe in Aqua dest. gebracht. Die derartig vorbehandelten Präparate wurden zur Herstellung von Autoradiogrammen kurz in ILFORD K_2-Emulsion getaucht, anschließend für 1 Tag luftgetrocknet und dann in luftdichten Kästen bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Die Expositionszeit betrug 14 Tage. Entwickelt wurden die Autoradiogramme in D19-KODAK-Entwickler in 5 Min. bei 20°C und dann 10 Min. fixiert. Nach Wässerung (30 Min.) wurden die Präparate mit Hämalaun nach Mayer (ROMEIS, 1968) gefärbt, getrocknet und mit Eukitt eingedeckt.

3.1.5 Histologische und histometrische Untersuchungen

Ausgewertet wurden Präparate des linken Hodens.
Um mögliche Unterschiede zwischen zentral und peripher gelegenen Tubuli mitzuerfassen, wurden alle histologischen Schnitte mäanderförmig abgesucht.
Damit eine subjektive Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse ausgeschlossen werden konnte, wurden alle Präparate "blind" ausgewertet, das heißt es war dem Untersuchenden nicht bekannt, ob der jeweilige Schnitt von einem kallikreinbehandelten Tier oder einer Kontrollratte stammte.
Das histologische Bild wurde bei der jeweils gewählten Vergrößerung fokussiert und nur in dieser Ebene ausgewertet. Bei den Geschlechtszellen der 5 Tage alten Ratten in Versuch I wurden darüber hinaus nur solche Zellen gezählt, die einen deutlichen Nucleolus aufwiesen.

3.1.5.1 Zellzahlbestimmungen

Bei den 5 Tage alten Ratten mit einmaliger Kallikreininjektion wurden Stütz-, Wand- und Geschlechtszellen ausgewertet. Bestimmt wurde die Anzahl dieser Zellen in insgesamt 100 runden Tubulusquerschnitten pro Tier. Da die Hoden der 5 Tage alten Tiere sehr klein waren, mußten die Schnitte sowohl vom rechten als auch vom linken Organ ausgewertet werden. Die Auszählung erfolgte bei 1250-facher Vergrößerung (10x1,25x100) mit Ölimmersion.
In den weiteren Versuchen mit präpubertären Ratten wurden die Hoden 20, 25 und 35 Tage alter Tiere ausgewertet. Bei letzteren ist das Keimepithel fast vollständig ausgebildet. Es treten bereits Spermatiden auf, die eine Unterscheidung der Stadien nach LEBLOND und CLERMONT (1952a) erlauben. Bei 500-facher Vergrößerung (10x1,25x40) wurden 100 bzw. 50 möglichst runde Tubulusquerschnitte mit dem Stadium X (LEBLOND und CLERMONT, 1952a) ausgewertet. Gezählt wurden Sertolizellen, A-Spermatogonien (A_2 mit A_0) sowie pachytäne Spermatozyten. Bei den Tieren, die das Kallikreinversuchspräparat Bay d 7687 erhalten hatten, wurden die A-Spermatogonien nicht gesondert erfaßt.
Wie CLERMONT und PEREY (1957) und HILSCHER und MAKOSKI (1968) zeigen konnten, laufen die spermatogenen Prozesse während der frühen Phase der Spermatogenese nach denselben Gesetzmäßigkeiten ab wie beim geschlechtsreifen Tier. Wenn auch Spermatiden zu diesem Zeitpunkt noch fehlen, so ist doch eine weitgehende Klassifizierung durch die auch hier auftretenden typischen Zellverbände von Spermatogonien und frühen Stadien der Spermatozyten (bis zu pachytänen Formen) möglich. So wurden bei den 20 und 25 Tage alten Tieren je 50 Tubulusquerschnitte ausgewertet, die A-Spermatogonien und pachytäne Spermatozyten enthielten. Da die Spermatogeneseentwicklung bei den 20 Tage alten Wistarratten etwas langsamer zu verlaufen schien als bei

den anderen Tieren dieser Altersgruppe, mußten hier leptotäne anstelle von pachytänen Formen gezählt werden. Angegeben wird jeweils die durchschnittliche Anzahl von Zellen pro Tubulusquerschnitt.

3.1.5.2 Mitoseindex

Für die Bestimmung der Mitoseindices bei 5 Tage alten Ratten wurden jeweils 100 runde Tubulusquerschnitte ausgewertet. Bestimmt wurden die Gesamtzahl der Zellen und die Anzahl der Zellen, die sich in der Mitose befanden. Als Mitoseformen wurden Pro-, Meta-, Ana-, Telo- und Rekonstruktionsphasen angesprochen.
Der Mitoseindex wurde berechnet pro 1000 Zellen.

3.1.5.3 Bestimmung des Tubulusdurchmessers

Für die Bestimmung des Tubulusdurchmessers wurden die histologischen Schnitte unter Verwendung eines Zeichentubus (ZEISS) mit 50-facher Vergrößerung auf Papier projiziert und von jedem linken Hoden 50 möglichst runde Tubulusquerschnitte gezeichnet. Um eine unbewußte, subjektive Selektion der zu zeichnenden Tubuli zu vermeiden und randständige wie zentral gelegene Tubuli zu erfassen, wurden die Hodenschnitte mäanderförmig abgesucht.

In den Tubuli wurden die Mittelpunkte gekennzeichnet und durch diese jeweils zwei senkrecht aufeinanderstehende Geraden gelegt, von denen die eine den größten Durchmesser darstellte. Die Länge der Durchmesser wurde mit einer Schublehre bestimmt. Der Mittelwert errechnete sich somit aus 100 Einzelbestimmungen, die addiert und durch 100 geteilt wurden.

3.1.5.4 Bestimmung des prozentualen Flächenanteils des Germinativums

Die histometrische Bestimmung des prozentualen Flächenanteils des Germinativums erfolgte mit einem Integrationsokular I (ZEISS), das 25 Schnittpunkte aufweist (HENNIG, 1958). Ausgewertet wurden 2500 Schnittpunkte, das heißt 100 verschiedene Einstellungen pro Hoden. Schrumpfräume, große Blutgefäße oder starke Bindegewebssepten wurden gesondert erfaßt. Ihrem Anteil entsprechend wurden in Anlehnung an die Untersuchungsmethode von STRÖBEL (1967) einige Blickfelder pro Präparat zusätzlich ausgewertet. Die Trefferquote für das Germinativum wird angegeben in Prozent pro 2500 Schnittpunkte.

3.1.5.5 Parameter für die Beurteilung der Hodenschädigung und der Regeneration des Keimepithels

Zur Beurteilung der Intensität der Hodenschädigung und der Regeneration wurden neben den Hoden- und Nebenhodengewichten das histologische Erscheinungsbild der Tubuli seminiferi und die Bestimmung der Tubulusdurchmesser herangezogen. Im Reproduktionsversuch wurden die Dauer der sterilen Periode und die Wurfgröße nach der ersten fertilen Paarung bestimmt.

Die histologischen Veränderungen im Anschluß an die Hodenschädigung wurden in Anlehnung an die Arbeiten von BOWLER (1972) und COLLINS und LACY (1969) nach folgendem Schema beurteilt:

1) keine sichtbaren Veränderungen : normale Spermatogenese
2) Fehlen von pachytänen Spermatozyten oder von Spermatiden, einige Riesenzellen : leichte Schädigung
3) mehrere Zellarten fehlen, Stadien des Spermatogenesezyklus können nicht mehr bestimmt werden, vermehrt Riesenzellbildung, Ring-Phänomen, Zelldetritus : mittlere Schädigung
4) Tubuli sind leer bis auf einige Sertolizellen und vereinzelte Spermatogonien, starker Zelldetritus : schwere Schädigung

Das Auftreten neugebildeter Spermatozyten und Spermatiden wurde als Zeichen einer fortgeschrittenen Regeneration gewertet.
Um einen repräsentativen Überblick über den Grad der Schädigung bzw. der Regeneration zu erhalten, wurden von jedem Hoden insgesamt 25 bis 30 Schnitte aus drei verschiedenen Teilen des Hodens beurteilt.

3.1.5.6 Auswertung der Autoradiogramme

Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte an je 100 runden Tubulusquerschnitten des linken Hodens. Ermittelt wurde die Anzahl von markierten Stütz-, Wand- und Geschlechtszellen. Unter Markierung versteht man die im Mikroskop sichtbaren geschwärzten Silberkörner der Filmemulsion. Die Schwärzung der Silberkörner erfolgt durch die ß-Strahlung des in den Zellkern aufgenommenen 3H-Thymidin (FISCHER und WERNER, 1971).
Als markiert wurden Zellen angesehen, die mindestens 4 Silberkörner mehr aufwiesen als durch den Nulleffekt im Tubulusquerschnitt zu erwarten war. Unter dem Nulleffekt versteht man Markierungen auf dem Film, die nicht vom 3H-Thymidin herrühren, sondern durch die Handhabung und Lagerung des Materials entstehen. Die Bestimmung des Nulleffektes war bei den vorliegenden Präparaten auf Grund starker Schwankungen von Tubulus zu Tubulus sehr schwierig. Für jeden Tubulusquerschnitt mußte daher der Nulleffekt getrennt ermittelt werden. Aus demselben Grund war es auch nicht möglich, die genaue Anzahl der markierten Silberkörner pro Zelle zu bestimmen.

3.1.6 Versuche zur Bestimmung biochemischer Parameter

Da bekannt ist, daß Rattenseren eine hohe Hemmkapazität für Schweinepankreaskallikrein besitzen und ein Blutdruckabfall bei dieser Spezies mit physiologischen Dosen von Kallikrein nicht erreichbar ist, wurde überprüft, ob die Ratte von der biochemischen Seite her als Modell für die Untersuchungen über einen Einfluß von Kallikrein auf den Hoden geeignet ist.

Bestimmt wurden die α_1-Antitrypsin-Gesamtkapazität (da α_1-Antitrypsin im menschlichen Serum als Progressiv-Antikallikrein identifiziert ist) als Maß für die Hemmkapazität von Rattenseren und die in vitro-Hemmung verschiedener Dosierungen von Kallikrein durch Rattenseren. Die Restaktivität des Kallikrein wurde 5 bis 15 Minuten und 23 Stunden nach Zugabe von Rattenseren bestimmt. Für diese beiden Untersuchungen wurde von unbehandelten 5, 15, 20 und 35 Tage alten Ratten Blut durch Herzpunktion gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte in Äthernarkose. Die Seren jeweils einer Altersstufe wurden gepoolt.

Bei adulten Ratten mit und ohne experimentell geschädigten Hoden wurde versucht, indirekt über die Bestimmung von freisetzbarem Bradykinin aus dem Plasma im Anschluß an eine einmalige Applikation von 1000 und 10 000 KE/kg KG eine Aussage über das Verhalten des Kininogenspiegels zu machen. Die Methode der Hodenschädigung wurde bereits beschrieben (3.1.2.3). Für die Plasmagewinnung wurde Blut aus dem retrobulbären Venenplexus nach der Methode von NÖLLER (1955) entnommen. Die Blutentnahme erfolgte zur Bestimmung des Nullwertes 15 Minuten vor der Kallikreinapplikation. Es wurden hier nach Möglichkeit Doppelbestim-

mungen durchgeführt. Die Werte in den Abb. 6 und 7 sind die daraus berechneten Mittelwerte. Im Anschluß an die Kallikreinapplikation wurde viermal Blut genommen, und zwar 5, 10, 30 und 60 Minuten danach. Um eine unspezifische Kininfreisetzung zu vermeiden, wurde mit Plastikgefäßen gearbeitet. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen aufgefangen und für 10 Minuten bei 200 - 500 g zentrifugiert. Die Plasmaproben wurden dann nach folgendem Schema konserviert, um eine vorzeitige Kininfreisetzung durch proteolytische Enzyme auszuschließen:

200 µl Plasma wurden 5 ml einer 1/10n
Essigsäure zugesetzt und
der Ansatz für 30 Min. bei 100°C gekocht.

Die Aufbewahrung der Proben bis zur Aufarbeitung erfolgte bei -80°C.

3.1.7 Die Testverfahren für die Bestimmung biochemischer Parameter

Die Bestimmung der α_1-Antitrypsin Gesamthemmkapazität der Seren juveniler Ratten sowie die Bestimmung des freisetzbaren Bradykinins aus Plasma gesunder und vorgeschädigter Ratten nach einmaliger Kallikreinapplikation wurden im Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München durchgeführt.

Die Methode zur Bestimmung der Trypsinhemmkapazität findet sich bei BERGMEYER (1974). Die Hemmkapazität wird angegeben als α_1-Antitrypsin mIU/ml Serum.

Die Kallikreinhemmung durch Rattenserum wurde über die Bestimmung der Restaktivität von Kallikrein mittels des kombinierten BAEE/ADH-Tests (BERGMEYER, 1974) bestimmt. In diesem Test dient BAEE (Benzoyl-L-Arginin-äthylester) als synthetisches Substrat für das Kallikrein. Das dabei entstehende Äthanol wird über NAD (ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid) photometrisch gemessen. Die Restaktivität des Pankreaskallikreins wird angegeben in Prozent der Ausgangsaktivität (ohne Serum).

Für die Bestimmung des aus Plasma freisetzbaren Bradykinin (ng freisetzbares Bradykinin/ml Plasma) wurde zur Kininliberierung aus dem Kininogen eine modifizierte Methode nach DINIZ und CARVALHO (1963) angewandt und die Austestung anschließend am isolierten Rattenuterus (MANN et al., 1976) vorgenommen.

3.1.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit der Varianzanalyse (MUDRA, 1958) und dem Scheffé-Test (ADAM et al., 1971).

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Einfluß einer einmaligen Kallikreinapplikation auf das Keimepithel der 5 Tage alten Ratte

Die einmalige Injektion von 1, 10 oder 100 E Kallikrein/kg Körpergewicht, verabreicht 1, 2 und 25 Stunden vor der Tötung (5 Tage + 1 Stunde p.n.) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die durchschnittliche Anzahl von Stütz- und Wandzellen pro Tubulusquerschnitt (Tab.1).

Tab. 1: Anzahl der Stütz- und Wandzellen in den Hodentubuli 5 Tage alter Ratten nach einmaliger Kallikreinapplikation ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	Gruppe	Behandlungszeitpunkt in Stunden vor der Tötung	n	Zellzahl pro Tubulusquerschnitt Stützzellen	Wandzellen
Kontrolle (physiol.Kochsalzlösung)	K	1	5	13.4 ± 1,5	11,1 ± 0,9
		2			
		25			
1 KE/kg KG *)	A	1	5	14,2 ± 1,3	11,5 ± 1,1
	B	2	5	12,8 ± 1,0	9,9 ± 0,6
	C	25	5	11,4 ± 0,5	9,3 ± 0,3
10 KE/kg KG	D	1	5	13,5 ± 0,8	10,4 ± 0,5
	E	2	5	13,5 ± 0,6	9,4 ± 0,4
	F	25	5	12,8 ± 1,5	10,6 ± 0,9
100 KE/kg KG	G	1	5	16,0 ± 1,2	11,5 ± 0,5
	H	2	5	11,0 ± 0,6	9,0 ± 0,4
	I	25	5	12,9 ± 1,8	9,9 ± 1,3

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Auch die Anzahl der Geschlechtszellen in 100 Tubulusquerschnitten pro Tier ließ keine nachweisbaren Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren erkennen (Tab. 2).

Tab. 2: Anzahl der Geschlechtszellen in den Hodentubuli 5 Tage alter Ratten nach einmaliger Kallikreinapplikation ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	Gruppe	Behandlungszeitpunkt in Stunden vor der Tötung	n	Anzahl von Geschlechtszellen in 100 Tubulusquerschnitten
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	K	1 2 25	2 2 1 } 5	24,2 ± 4,3
1 KE/kg KG *)	A	1	5	30,8 ± 3,9
	B	2	5	22.6 ± 1,8
	C	25	5	22,8 ± 1,2
10 KE/kg KG	D	1	5	32,4 ± 5,5
	E	2	5	25,4 ± 3,8
	F	25	5	24,8 ± 4,6
100 KE/kg KG	G	1	5	36,8 ± 4,4
	H	2	5	24,6 ± 2,9
	I	25	5	30,2 ± 4,2

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Allgemein fiel jedoch auf, daß die Werte der Kontrolltiere meist niedriger lagen als die der behandelten Tiere. Der Mitoseindex für die Stütz- und Wandzellen lag bei fast allen kallikreinbehandelten Tieren höher als bei den Kontrollratten. Statistisch signifikante Unterschiede konnten jedoch nicht festgestellt werden (Tab. 3). Für die Geschlechtszellen konnte der Mitoseindex auf Grund des zu geringen Zahlenmaterials nicht berechnet werden.

Tab. 3: Mitoseindices (‰) für Stütz- und Wandzellen 5 Tage alter Ratten nach einmaliger Kallikreinapplikation ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	Gruppe	Behandlungszeitpunkt in Stunden vor der Tötung	n	Mitoseindices Stützzellen	Wandzellen
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	K	1	2	20,0 ± 1,3	9,8 ± 2,2
		2	2		
		25	1		
1 KE/kg KG*)	A	1	5	26.6 ± 0,7	12,5 ± 2,4
	B	2	5	23,4 ± 4,1	9,1 ± 1,9
	C	25	5	26,2 ± 2,8	11,4 ± 2,5
10 KE/kg KG	D	1	5	22,6 ± 2,9	14,4 ± 2,4
	E	2	5	23,8 ± 4,2	12,0 ± 4,6
	F	25	5	27,6 ± 5,1	10,6 ± 1,3
100 KE/kg KG	G	1	5	24,5 ± 3,8	13,4 ± 4,9
	H	2	5	23,2 ± 3,9	11,4 ± 1,0
	I	25	5	26,5 ± 2,5	13,3 ± 1,7

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Die Auswertung der Autoradiogramme ließ die Tendenz einer erhöhten 3H-Thymidin-Inkorporation nach Kallikreinapplikation erkennen. Angegeben wird die Gesamtzahl der markierten Zellen (Tab. 4) und der prozentuale Anteil markierter Zellen (Tab. 5, Abb. 3), berechnet für die Gesamtzahl der Zellen in 100 Tubuli.

Tab. 4: Einfluß von Kallikrein (1, 10, 100 KE pro kg KG) auf die Aufnahme von 3H-markiertem Thymidin in Stütz-, Wand- und Geschlechtszellen 5 Tage alter Ratten. Die Kallikreinapplikation erfolgte 24 und 1 Stunde vor oder zusammen mit der 3H-Thymidingabe*) ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Gruppe	Behandlung: KE/kg KG	Std.**)	n	3H - markierte Zellen in 100 Tubulusquerschnitten: Stützzellen	Wandzellen	Geschlechtszellen
K	phys. Kochsalzlösung	0/1/24	4	96 ± 18	25 ± 6	3 ± 1
A	1	0	4	311 ± 13	64 ± 14	15 ± 3
B	1	1	5	167 ± 29	47 ± 7	7 ± 2
C	1	24	4	189 ± 27	49 ± 7	11 ± 3
D	10	0	4	161 ± 38	39 ± 7	4 ± 1
E	10	1	5	145 ± 27	39 ± 5	11 ± 4
F	10	24	5	231 ± 54	51 ± 16	9 ± 2
G	100	0	5	130 ± 20	27 ± 5	4 ± 1
H	100	1	4	98 ± 27	32 ± 7	5 ± 3
I	100	24	5	123 ± 18	30 ± 7	4 ± 1

*) Alle Tiere erhielten 5,0 Tage p.n. 2 µCi 3H Thymidin pro g KG i.p. appliziert. Die Tötung erfolgte 1 Stunde später.

**) KE/kg KG - Std. = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht - ... Stunden vor der Applikation von 3H-Thymidin.

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

Tab. 5: Einfluß von Kallikrein (1, 10, 100 E/kg KG) auf die Aufnahme von 3H-markiertem Thymidin in Stütz-, Wand- und Geschlechtszellen 5 Tage alter Ratten. Die Kallikreinapplikation erfolgte 24 und 1 Stunde vor oder zusammen mit der 3H-Thymidingabe.[+)] Bestimmt wurde der Prozentsatz markierter Zellen in 100 Tubulusquerschnitten ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Gruppe	Behandlung KE/kg KG - Std.[++)]		n	% markierte Stützzellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	% markierte Wandzellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	% markierte Geschlechtszellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
K	physiol.Kochsalzlösung	0/1/24	4	7,3 ± 1,8	2,2 ± 0,6	10,3 ± 3,7
A	1	0	4	20,7 ± 1,3	5,4 ± 1,1	42,8 ± 7,4
B	1	1	5	13,2 ± 2,1	4,8 ± 0,7	30,6 ± 6,1
C	1	24	4	17,0 ± 3,3	5,3 ± 0,7	49,2 ± 13,1
D	10	0	4	11,1 ± 2,4	3,6 ± 0,9	11,5 ± 4,9
E	10	1	5	10,6 ± 1,7	4,2 ± 0,5	38,0 ± 7,0
F	10	24	5	18,1 ± 4,3	4,8 ± 1,4	43,3 ± 14,9
G	100	0	5	8,1 ± 1,1	2,4 ± 0,3	11,1 ± 3,3
H	100	1	4	9,3 ± 2,9	3,7 ± 0,8	21,8 ± 16,2
I	100	24	5	10,6 ± 2,1	3,2 ± 0,8	12,8 ± 4,8

+) Alle Tiere erhielten 5,0 Tage p.n. 2 µCi 3H-Thymidin pro kg KG i.p.; die Tötung erfolgte1 Stunde später.

++) KE/kg KG - Std.: Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht - ... Stunden vor der 3H-Thymidinapplikation

——— Diff. P ⩽ 0,05 (Scheffé-Test)

═══ Diff. P ⩽ 0,01 (Scheffé-Test)

Für den prozentualen Anteil markierter Zellen wurde statistisch die Abhängigkeit der Ergebnisse von den Faktoren Dosierung und Zeit berechnet (Varianzanalyse, Scheffé-Test). Der Faktor Dosierung wurde wie folgt definiert: Dosierung (1, 10, 100 KE/kg KG) variabel, Zeitpunkt der Applikation konstant. Entsprechend wurde der Faktor Zeit definiert: Zeit (0, 1, 24 Stunden vor der 3H-Thymidingabe) variabel, Dosierung konstant.

Für die Wandzellen waren alle berechneten Differenzen zwischen der Kontrolle und den Gruppen sowie zwischen den einzelnen Gruppen mit $P \geq 0,05$ (Scheffé-Test) nicht signifikant.
Bei den Stützzellen war der Prozentsatz der markierten Zellen bei der Gruppe A, die 1 KE/kg KG 0 Stunden vor der 3H-Thymidinapplikation erhalten hatte, im Vergleich zur Kontrolle hochsignifikant erhöht ($P \leq 0,01$, Scheffé-Test). Dies galt sowohl für den Faktor Zeit als auch für den Faktor Dosierung.
Bei den Geschlechtszellen war die 3H-Thymidin-Inkorporation nach Applikation von 1 KE/kg KG zum Zeitpunkt 0 Stunden (Gruppe A) im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ($P \leq 0,05$, Scheffé-Test). Für die drei Dosierungen 1, 10 und 100 KE/kg KG (Gruppe A, D, G), appliziert zum Zeitpunkt 0 Stunden vor H3-Thymidin, konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der markierten Zellen nach Gabe von 1 KE/kg KG (Gruppe A) signifikant höher lag ($P \leq 0,05$, Scheffé-Test) als bei den übrigen Dosierungen. In Abhängigkeit von der Zeit war der Prozentsatz markierter Geschlechtszellen nach Applikation von 1 KE/kg KG 24 Stunden vor der 3H-Thymidininjektion (Gruppe C) am höchsten (Differenz zur Kontrolle $P \leq 0,05$, Scheffé-Test).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Prozentsatz markierter Stütz- und Geschlechtszellen nach Applikation von 1 KE/kg KG 0 Stunden bzw. 0 und 24 Stunden vor der 3H-Thymidinapplikation signifikant erhöht war.

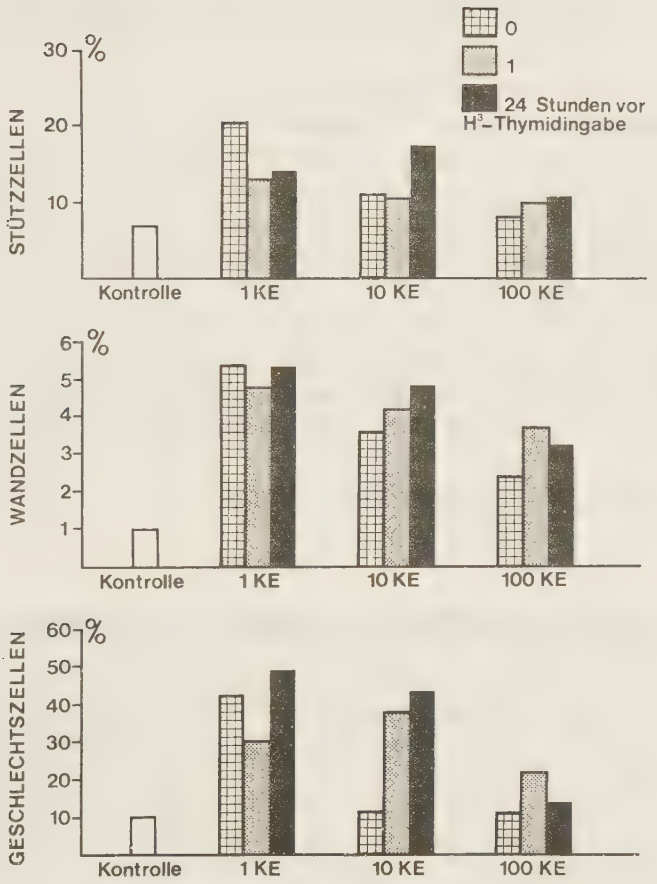

Abb. 3: Markierungsindices: Prozentualer Anteil markierter Geschlechts-, Stütz- und Wandzellen in 100 Tubulusquerschnitten nach Applikation von 1, 10 und 100 KE/kg KG 0, 1 und 24 Stunden vor der 3H-Thymidingabe. Die Tötung der Tiere erfolgte 1 Stunde später. Die Kontrollratten erhielten physiolog. Kochsalzlösung

3.2.2 Einfluß einer Langzeitmedikation mit Kallikrein auf die Spermatogenese der präpubertären Ratte

Das Versuchspräparat "Kallikrein" Bay d 7687*) in Dosierungen von 1, 5 und 10 E/kg KG, täglich subcutan appliziert, vom 5. bis 20. Lebenstag, hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Körpergewichtsentwicklung und das Organwachstum von Hoden, Nebenhoden oder Samenblasendrüsen prämaturer, männlicher Ratten bis zum 35. Lebenstag (Tabelle 6).
Ebenfalls wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede für die durchschnittliche Anzahl von Sertolizellen und pachytänen Spermatozyten in den Hodentubuli bei Kontroll- und Versuchstieren gefunden (Tab. 7).

Toxische Einflüsse durch das verwendete Kallikrein wurden in keinem Fall beobachtet.

Tab. 6: Körper- und Organgewichte 35 Tage alter Ratten nach Behandlung mit dem Versuchspräparat "Kallikrein" Bay d 7687 vom 5. – 20. Lebenstag ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

		Körpergewicht			Organgewichte		
		5. Tag	20. Tag	35. Tag	Hoden	Nebenhoden	Samenblasendrüsen
Behandlung	n	g	g	g	mg	mg	mg
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	8	9,3 ± 0,04	34,7 ± 1,0	120 ± 2,3	1000 ± 27	149 ± 5	29 ± 2
1 KE/kg KG*)	8	9,7 ± 0,03	36,4 ± 1,7	128 ± 3,9	1100 ± 35	146 ± 6	32 ± 4
5 KE/kg KG	8	9,8 ± 0,04	35,4 ± 1,5	123 ± 3,1	1130 ± 64	153 ± 9	36 ± 2
10 KE/kg KG	8	9,6 ± 0,03	34,7 ± 1,7	120 ± 3,0	1060 ± 43	149 ± 4	34 ± 2

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

*) Versuchspräparat mit der Bezeichnung "Kallikrein" Bay d 7687, Fa. Bayer, Leverkusen (40 E/Ampulle)

Tab. 7: Anzahl der Sertolizellen und pachytänen Spermatozyten am 35. Lebenstag von Ratten, die zwischen dem 5. und 20. Tag mit dem Versuchspräparat "Kallikrein" Bay d 7687 behandelt wurden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Zellzahl pro Tubulusquerschnitt	
		Sertolizellen	pachytäne Spermatozyten
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	8	11,9 ± 0,2	40,3 ± 0,9
1 KE/kg KG *)	8	11,2 ± 0,4	34,5 ± 3,3
5 KE/kg KG	8	11,6 ± 0,7	37,3 ± 1,3
10 KE/kg KG	8	11,6 ± 0,2	38,6 ± 1,4

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Die Verabreichung von hochgereinigtem Schweinepankreaskallikrein (1, 5, 10 und 100 E/kg KG) vom 5. bis 20. Lebenstag hatte keinen Einfluß auf das Körpergewicht sowie die Gewichte von Hoden und Samenblasendrüsen. Die Nebenhodengewichte der mit Kallikrein behandelten Tiere lagen dagegen über denen der Kontrolltiere. (Alle Differenzen zur Kontrolle $P \geq 0{,}05$, Scheffé-Test).
Die Ergebnisse für die am 20. und 35. Tag getöteten Tiere sind in den Tabellen 8 und 9 zusammengefaßt.

Tab. 8: Körper- und Organgewichte 20 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten nach Behandlung mit Kallikrein vom 5. bis 20. Lebenstag ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Körpergewicht 5. Tag g	Körpergewicht 20. Tag g	Organgewichte Hoden mg	Organgewichte Nebenhoden*) mg	Organgewichte Samenblasendrüsen mg
Kontrolle (physiol.Kochsalzlösung)	4	12,6 ± 0,4	42,8 ± 0,2	193 ± 9,5	22 ± 2,4	7,8 ± 1,0
1 KE/kg KG**)	5	12,2 ± 0,4	38,6 ± 1,6	188 ± 9,9	27 ± 1,2	8,2 ± 1,0
5 KE/kg KG	5	12,9 ± 0,6	39,7 ± 1,7	207 ± 13,4	35 ± 3,8	12,0 ± 2,0
10 KE/kg KG	4	12,2 ± 0,2	37,9 ± 2,0	197 ± 19,3	27 ± 2,9	7,5 ± 1,0
100 KE/kg KG	5	12,2 ± 0,5	41,0 ± 0,6	208 ± 2,7	35 ± 3,6	12,0 ± 2,5

*) Varianzanalyse, F-Test, $P \leq 0{,}05$

**) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 9: Körper- und Organgewichte 35 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten nach Behandlung mit Kallikrein vom 5. – 20. Lebenstag ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Körpergewicht 5. Tag g	Körpergewicht 20. Tag g	Körpergewicht 35. Tag g	Organgewichte Hoden mg	Organgewichte Nebenhoden mg	Organgewichte Samenblasendrüsen mg
Kontrolle (physiol.Kochsalzlösung)	8	13,4 ± 0,2	46,6 ± 0,7	141 ± 2	1219 ± 37	129 ± 7	23 ± 3
1 KE/kg KG*)	8	13,4 ± 0,3	46,7 ± 0,8	143 ± 2	1297 ± 38	136 ± 6	26 ± 3
5 KE/kg KG	8	13,2 ± 0,2	46,9 ± 0,6	141 ± 1	1279 ± 30	133 ± 6	27 ± 2
10 KE/kg KG	8	13,5 ± 0,2	46,8 ± 1,3	145 ± 2	1248 ± 20	131 ± 4	25 ± 2
100 KE/kg KG	8	13,4 ± 0,2	47,2 ± 0,9	144 ± 3	1265 ± 20	122 ± 5	23 ± 2

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Die histologische Untersuchung des Hodengewebes erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren.
Die Angaben über die durchschnittliche Zahl von Stütz- und Sertolizellen und pachytänen Spermatozyten (Phase X nach LEBLOND und CLERMONT, 1952a) pro Tubulusquerschnitt am 20. und 35. Lebenstag der Versuchstiere finden sich in Tabelle 10 und 11. Bei den 20 Tage alten Tieren wurde außerdem die durchschnittliche Zahl von A-Spermatogonien in Phase X bestimmt. Es wurden auch hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt.
Die mittleren Tubulusdurchmesser sowohl der 20 als auch der 35 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten wichen zwischen den einzelnen Gruppen nicht wesentlich voneinander ab (Tab. 12).

Tab. 10: Anzahl der Stützzellen, A-Spermatogonien und pachytänen Spermatozyten pro Tubulusquerschnitt am 20. Tag von Sprague-Dawley-Ratten, die vom 5. bis 20. Tag mit Kallikrein behandelt wurden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Anzahl der Zellen pro Tubulusquerschnitt		
		Stützzellen	A-Spermatogonien	pachytäne Spermatozyten
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	4	14,3 ± 0,6	1,04 ± 0,07	4,1 ± 0,47
1 KE/kg KG*)	5	14,6 ± 0,4	1,01 ± 0,12	2,9 ± 0,23
5 KE/kg KG	5	13,9 ± 0,4	0,91 ± 0,09	3,7 ± 0,26
10 KE/kg KG	4	14,4 ± 0,7	0,88 ± 0,11	3,5 ± 0,68
100 KE/kg KG	5	14,4 ± 0,4	0,98 ± 0,10	4,0 ± 0,42

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 11: Anzahl der Sertolizellen und pachytänen Spermatozyten am 35. Lebenstag von Sprague-Dawley-Ratten, die vom 5. bis 20. Tag mit Kallikrein behandelt wurden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Anzahl pro Tubulusquerschnitt pachytäne Spermatozyten	Sertolizellen
Kontrolle: (physiol. Kochsalzlösung)	8	44,5 ± 1,0	12,1 ± 0,5
1 KE/kg KG*)	8	44,6 ± 1,4	13,1 ± 0,4
5 KE/kg KG	8	40,3 ± 2,4	12,4 ± 0,3
10 KE/kg KG	8	42,4 ± 0,8	13,1 ± 0,2
100 KE/kg KG	8	43,8 ± 1,2	12,8 ± 0,4

*) KE/kg KG = Kallikreineinheiten pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 12: Einfluß von Kallikrein (appliziert vom 5. bis 20. Lebenstag) auf die mittleren Tubulusdurchmesser 20 und 35 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Tubulusdurchmesser 20. Tag µ	n	Tubulusdurchmesser 35. Tag µ
Kontrolle: (physiol.Kochsalzlösung)	4	116 ± 2,8	8	198 ± 2,0
1 KE/kg KG*)	5	110 ± 5,8	8	202 ± 2,0
5 KE/kg KG	5	113 ± 7,7	8	200 ± 2,9
10 KE/kg KG	4	112 ± 7,1	8	200 ± 3,0
100 KE/kg KG	5	116 ± 6.1	8	200 ± 2,1

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 13: Einfluß von Kallikrein (appliziert vom 5. bis 20. Lebenstag) auf den prozentualen Anteil des Germinativums am Hodengewebe 20 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten

Behandlung	n	Germinativum %
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	4	91,0
1 KE/kg KG*)	5	91,3
5 KE/kg KG	5	91,2
10 KE/kg KG	4	90,3
100 KE/kg KG	5	91,3

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Der prozentuale Anteil des Germinativums bzw. des Interstitiums am Hodengewebe war bei Kontroll- und Versuchstieren am 20. Lebenstag gleich groß. Er betrug ca. 90 - 91 % (Tab. 13).
Auch bei diesen Versuchen mit hochgereinigtem Kallikrein wurden keine störenden Einflüsse beobachtet.

Die Körpergewichte der vom 1. bis 2o., 1. bis 25. und 1. bis 35. Lebenstag mit Kallikrein (100, 1000 KE/kg KG) behandelten Wistarratten wichen statistisch nicht signifikant von denen der Kontrollgruppen ab (Tab. 14, 15, 16). Bei den 20 Tage alten Ratten lagen die Hoden- und Nebenhodengewichte der mit Kallikrein behandelten Tiere durchschnittlich höher als bei den Tieren, die nur das Placebo erhalten hatten (Tab. 14). Im Falle der Hodengewichte ergab die Varianzanalyse einen statistisch signifikanten Unterschied ($P \leq 0{,}01$). Das Hodengewicht der Kontrolltiere betrug 142 mg gegenüber 151 mg und 148 mg für die mit 100 und 1000 KE/kg KG behandelten Ratten. Die Samenblasendrüsengewichte der 20 Tage alten Tiere unterschieden sich nicht wesentlich voneinander (Tab. 14).

Tab. 14: Körper- und Organgewichte 20 Tage alter Wistarratten nach Behandlung mit Kallikrein vom 1. bis 20. Lebenstag ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Körpergewicht 5. Tag g	Körpergewicht 20. Tag g	Organgewichte Hoden**) mg	Organgewichte Nebenhoden mg	Organgewichte Samenblasendrüsen mg
Kontrolle (physiol.Kochsalzlösung)	10	10,6 ± 0,2	30,4 ± 0,7	142 ± 5	19 ± 1	4 ± 0,4
100 KE/kg KG *)	10	10,7 ± 0,2	29,6 ± 0,9	151 ± 8	24 ± 2	5 ± 0,8
1000 KE/kg KG	10	10,8 ± 0,2	30,8 ± 0,9	148 ± 6	20 ± 2	3 ± 0,4

**) Varianzanalyse, F-Test, $P \leq 0{,}01$

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 15: Körper- und Organgewichte 25 Tage alter Wistarratten nach Behandlung mit Kallikrein vom 1. bis 25. Lebenstag ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Körpergewicht 5. Tag g	Körpergewicht 25. Tag g	Organgewichte Hoden mg	Organgewichte Nebenhoden mg	Organgewichte Samenblasendrüsen mg
Kontrolle (physiol.Kochsalzlösung)	10	10,6 ± 0,2	49,0 ± 1,4	337 ± 17	43 ± 3	8,4 ± 1,0
100 KE/kg KG*)	10	10,3 ± 0,2	48,1 ± 1,3	325 ± 11	39 ± 5	8,4 ± 1,4
1000 KE/kg KG	10	10,5 ± 0,2	47,9 ± 1,0	307 ± 15	31 ± 3	5,9 ± 0,7

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 16: Körper- und Organgewichte 35 Tage alter Wistarratten nach Behandlung mit Kallikrein vom 1. bis 35. Lebenstag ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Körpergewicht 5. Tag g	Körpergewicht 35. Tag g	Organgewichte Hoden mg	Organgewichte Nebenhoden mg	Organgewichte Samenblasendrüsen mg
Kontrolle (physiol.Kochsalzlösung)	10	10,5 ± 0,3	96,5 ± 1,4	1031 ± 21	103 ± 4	23 ± 1
100 KE/kg KG+)	10	10,4 ± 0,2	96,5 ± 2,1	1006 ± 28	91 ± 3	19 ± 1*)
1000 KE/kg KG	10	10,9 ± 0,3	94,9 ± 2,3	1018 ± 34	93 ± 4	22 ± 1

+) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

*) Differenz zu Kontrollen $P \leq 0,05$ (Scheffé-Test)

Bei den am 25. und am 35. Lebenstag getöteten Ratten entsprachen die Organgewichte denen der Kontrolltiere, oder sie lagen darunter (Tab. 15 und 16). Bei den 35 Tage alten Tieren war diese Tendenz bei der Gruppe, die 100 E Kallikrein erhalten hatte, statistisch abzusichern (Differenz zur Kontrolle $P \leq 0,05$).

Die quantitative histologische Auswertung der Hoden zeigte, wie auch bei den Versuchen mit niedriger Dosierung des Kallikrein, keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren.Auch die Zählung der Stütz- bzw. Sertolizellen sowie der A-Spermatogonien und leptotänen Spermatozyten erbrachte keine Hinweise auf einen Einfluß des Kallikreins auf die Hodenfunktion (Tab. 17, 18, 19). Auch die mittleren Tubulusdurchmesser der 20, 25 und 35 Tage alten Versuchstiere wichen von denen der Kontrolltiere nicht ab (Tab. 20).

Tab. 17: Anzahl der Stützzellen, A-Spermatogonien und leptotänen Spermatozyten am 20. Lebenstag von Wistarratten, die vom 1. bis 20. Lebenstag mit Kallikrein behandelt wurden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Anzahl der Zellen pro Tubulusquerschnitt		
		Stützzellen	A-Spermatogonien	leptotäne Spermatozyten
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	10	14,7 ± 0,5	1,2 ± 0,03	30,5 ± 0,8
100 KE/kg KG*)	10	14,2 ± 0,2	1,2 ± 0,08	32,8 ± 1,0
1000 KE/kg KG	10	14,7 ± 0,3	1,1 ± 0,04	31,7 ± 1,3

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 18: Anzahl der Stützzellen, A-Spermatogonien und pachytänen Spermatozyten am 25. Lebenstag von Wistarratten, die vom 1. bis 25. Lebenstag mit Kallikrein behandelt wurden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Anzahl der Zellen pro Tubulusquerschnitt		
		Stützzellen	A-Spermatogonien	pachytäne Spermatozyten
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	10	12,6 ± 0,2	0,7 ± 0,03	8,5 ± 0,6
100 KE/kg KG*)	10	12,5 ± 0,2	0,7 ± 0,03	8,5 ± 0,6
1000 KE/kg KG	10	13,4 ± 0,3	0,8 ± 0,04	9,5 ± 0,6

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 19: Anzahl der Sertolizellen, A-Spermatogonien und pachytänen Spermatozyten am 35. Lebenstag von Wistarratten, die vom 1. bis 35. Lebenstag mit Kallikrein behandelt wurden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Anzahl der Zellen pro Tubulusquerschnitt		
		Sertolizellen	A-Spermatogonien	pachytäne Spermatozyten
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	10	10,0 ± 0,2	1,1 ± 0,04	36,4 ± 1,1
100 KE/kg KG*)	10	9,5 ± 0,2	1,1 ± 0,06	35,1 ± 1,2
1000 KE/kg KG	10	9,9 ± 0,4	1,0 ± 0,05	38,4 ± 1,2

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 20: Einfluß von Kallikrein, appliziert täglich vom 1. bis 20., 1. bis 25. und 1. bis 35. Lebenstag, auf den Tubulusdurchmesser (µ) von 20, 25 und 35 Tage alten Wistarratten ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Tubulusdurchmesser		
		20. Tag µ	25. Tag µ	35. Tag µ
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	10	106 ± 2	138 ± 2	192 ± 5
100 KE/kg KG*)	10	108 ± 2	134 ± 2	195 ± 2
1000 KE/kg KG	10	110 ± 3	137 ± 2	198 ± 2

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

3.2.3 Einfluß einer Langzeitmedikation mit Kallikrein auf die Regeneration eines experimentell geschädigten Keimepithels bei postpubertären Ratten

Die Körpergewichte der mit Kallikrein behandelten Tiere unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt des Versuches signifikant von denen der Kontrollen (Tab. 21, 22, 23, 24, 25 und 26).
Bei allen Tieren machte sich am Anfang des Versuchs eine durch die Narkose und die lokale Hodenschädigung bedingte Wachstumsdepression bemerkbar. Das Körpergewicht der Tiere stagnierte, während sonst eine kontinuierliche Gewichtszunahme zu beobachten war (Tab. 21).

Tab. 21: Körpergewicht (in g) von Wistarratten am Tag der Hodenschädigung sowie am 5., 10., 42. und 104. Tag danach ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Tag der Untersuchung	n	Behandlung: Kontrolle (physiolog. Kochsalzlösung)	Kallikrein 100 KE/kg KG*)
Tag 0 = Schädigung	28	270 ± 1,8	270 ± 2,0
Tag 5 nach Schädigung	28	270 ± 2,0	271 ± 2,0
Tag 10 nach Schädigung	24	286 ± 1,8	288 ± 2,6
Tag 42 nach Schädigung	12	347 ± 4,6	349 ± 3,9
Tag 104 nach Schädigung	12	398 ± 7,4	400 ± 5,2

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Zur Überprüfung der Hodenschädigung wurden 7 Tage nach Einwirken der Noxe 8 Tiere getötet, und zwar je 4 aus der Kontroll- und Versuchsgruppe. Dafür wurden jeweils die leichtesten Tiere jeder Gruppe ausgewählt. Bei allen 8 Tieren war eine deutliche Gewichtsreduzierung bei Nebenhoden und Hoden zu beobachten

Tab. 22: Körper- und Organgewichte sowie Tubulusdurchmesser von 2 nicht geschädigten, ca. 80 Tage alten Wistarratten

	Körpergewicht g	Hoden mg	Nebenhoden mg	Samenblasendrüsen mg	Tubulusdurchmesser µ
Tier 1	304	2575	827	289	248
Tier 2	271	2728	841	288	268

Tab. 23: Körper- und Organgewichte der am 7. Tag nach der Schädigung getöteten Versuchs- und Kontrolltiere ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Körpergewicht g	Hoden mg	Nebenhoden mg	Samenblasendrüsen mg
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	4	263 ± 3	1887 ± 89	747 ± 22	273 ± 14
100 KE/kg KG *)	4	262 ± 2	1920 ± 122	825 ± 23	283 ± 11

*) KE/ kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

(Tab. 22, 23). Als Vergleich dienten zwei gleichaltrige, nicht geschädigte, unbehandelte Kontrolltiere. Die Gewichte der Samenblasendrüsen wichen dagegen nur geringfügig voneinander ab.

Die Hoden wurden histologisch qualitativ ausgewertet. Die Intensität der Hodenschädigung war von Tier zu Tier unterschiedlich, jedoch innerhalb des einzelnen Organs konstant.
Die Tubuli zeigten vornehmlich eine selektive Schädigung des Keimepithels. Daneben konnten jedoch auch Tubuli beobachtet werden, die außer Zelldetritus nur noch wenige basal gelegene Zellen enthielten. Bei diesen handelte es sich dem Aussehen nach um Sertolizellen und/oder A-Spermatogonien. Typisch für die selektiv geschädigten Tubuli war das Fehlen von primären Spermatozyten und jungen Spermatiden. Daneben

traten gelegentlich Riesenzellen auf, die wie Konglomerate von pachytänen Spermatozyten oder Spermatiden aussahen. Bei den Spermatiden konnte zusätzlich eine "ring formation" (CHOWDURY und STEINBERGER, 1967) des Kernchromatins beobachtet werden. Diese Zellen erinnern in ihrem Aussehen an einen Siegelring.

Die Organgewichte (Hoden, Nebenhoden, Samenblasendrüsen) der am 21. Tag nach der Schädigung getöteten Tiere (12 je Gruppe) ließen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den behandelten und den Kontrolltieren erkennen (Tab. 24). Auffallend war jedoch, daß die Hoden- und Nebenhodengewichte im Vergleich zu denen der am 7. Tag getöteten Tiere noch weiter zurückgegangen waren (vgl. Tab. 23). Die Gewichte der Samenblasendrüsen waren unverändert (Tab. 22, 23 und 24). Das Keimepithel aller Tiere zeigte noch deutlich die Spuren der Schädigung. Vereinzelt waren noch Riesenzellen und die "ring formation" zu sehen.

In den meisten Tubuli waren aber auch deutliche Zeichen dafür vorhanden, daß die Regeneration des Germinativums bereits eingesetzt hatte. Es traten wieder pachytäne Spermatozyten sowie junge Spermatiden auf. In den stärker geschädigten Tubuli war die Regeneration noch nicht so weit fortgeschritten oder fehlte ganz.

Tab. 24: Körper- und Organgewichte der am 21. Tag nach der lokalen Hodenschädigung getöteten Tiere ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Körpergewicht g	Hoden mg	Nebenhoden mg	Samenblasendrüsen mg
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	12	306 ± 1	1418 ± 24	614 ± 15	261 ± 6
100 KE/kg KG*)	12	313 ± 4	1454 ± 79	606 ± 20	269 ± 6

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tab. 25: Körper- und Organgewichte der am 104. Tag nach der lokalen Hodenschädigung getöteten Tiere, die bis zu diesem Zeitpunkt wieder fertil geworden waren ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Körpergewicht g	Hoden mg	Nebenhoden mg	Samenblasendrüsen mg
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	11	396 ± 8	2260 ± 113	746 ± 29	335 ± 13
100 KE/kg KG*)	9	399 ± 7	2050 ± 132	704 ± 35	334 ± 13

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Die Tubulusdurchmesser der geschädigten Tiere betrugen 183 µ für die Kontrollen und 180 µ für die mit Kallikrein behandelten Tiere. Sie lagen damit deutlich unter den Werten von 248 bzw. 268 µ, die für die zwei gesunden Ratten ermittelt worden waren (Tab. 23 und 27).
Die restlichen 24 geschädigten Ratten (12 Kontrollen, 12 nach Kallikreinbehandlung) zeigten während des Paarungszeitraumes (42. - 104. Tag) normale Libido und unverändertes Paarungsverhalten.
Die Hoden-, Nebenhoden- und Samenblasendrüsengewichte der mit Kallikrein behandelten Tiere unterschieden sich am 104. Tag nicht signifikant von denen der Kontrollratten

Tab. 26: Körper- und Organgewichte der am 104. Tag nach der lokalen Hodenschädigung getöteten Tiere, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht wieder fertil geworden waren ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Behandlung	n	Körpergewicht g	Hoden mg	Nebenhoden mg	Samenblasendrüsen mg
Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	1	422	1303	558	366
100 KE/kg KG*)	3	404 ± 5	1319 ± 134	550 ± 13	305 ± 7

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

(Tab. 25). Dasselbe gilt für die Tubulusdurchmesser (Tab. 27).

Bis zu diesem Zeitpunkt waren 11 der geschädigten Kontrolltiere und 9 der geschädigten und mit Kallikrein behandelten Tiere wieder fertil geworden.

Bei dem einen sterilen Kontrolltier und bei zwei der drei als steril angesehenen Ratten der Kallikreingruppe lagen die Organgewichte sowie die Tubulusdurchmesser deutlich unter denen der fertilen Tiere (Tab. 26 und 27). Die dazugehörigen Weibchen waren nach erneuter Paarung mit fertilen Rattenmännchen trächtig geworden. Die Organgewichte des dritten kallikreinbehandelten Tieres entsprachen denen der fertilen Tiere (Hoden 1782 mg, Nebenhoden 575 mg, Samenblasendrüsen 283 mg). Bei dem dazugehörigen Weibchen konnte nach erneuter Paarung mit einem fertilen Männchen nur eine Implantationsstelle gefunden werden, so daß unter Umständen auch das Weibchen nicht fertil war.

Tab. 27: Tubulusdurchmesser (μ) am 21. und 104. Tag nach der lokalen Hodenschädigung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Tag nach der Schädigung	Fertilitätszustand	n	Kontrolle (physiol. Kochsalzlösung)	n	Kallikrein 100 KE/kg KG*)
21.	steril	12	183 ± 2,5	12	180 ± 2,8
104.	fertil	11	242 ± 6,3	9	228 ± 7,0
	steril	1	189	3	163 ± 6,5

*) KE/kg KG = Einheiten Kallikrein pro kg Körpergewicht
n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Die histologischen Präparate der fertilen Ratten lassen eine fast vollständige Regeneration des Germinativums erkennen. Nur vereinzelt fanden sich Tubuli ohne Anzeichen einer Spermatogenese. Bei den nicht fertilen Tieren war der Anteil von Tubuli ohne Spermatogenesezellen größer als bei den fertil gewordenen, auch lagen die Werte der durchschnittlichen Tubulusdurchmesser niedriger (Tab. 27).
Der Reproduktionsversuch ergab, daß die geschädigten Ratten durchschnittlich ($\bar{x} \pm s$) nach 66,7 $\pm$ 3,3 (Kontrollen) bzw. 71,4 $\pm$ 5,5 Tagen (Kallikreingruppe) wieder fertil wurden. Der Zeitpunkt der neuen Fertilität, das heißt der Tag der ersten fertilen Kopulation wurde berechnet aus: Wurfdatum (in Tagen nach der Schädigung) abzüglich 21 Tage Gravidität. Die Anzahl der Jungen pro Wurf lag im Durchschnitt ($\bar{x} \pm s$) bei 10,6 $\pm$ 4,2 (Kontrollen) und 9,8 $\pm$ 3,6 (Kallikreingruppe) Tieren. Die ermittelten Werte lassen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen erkennen (Abb.4).

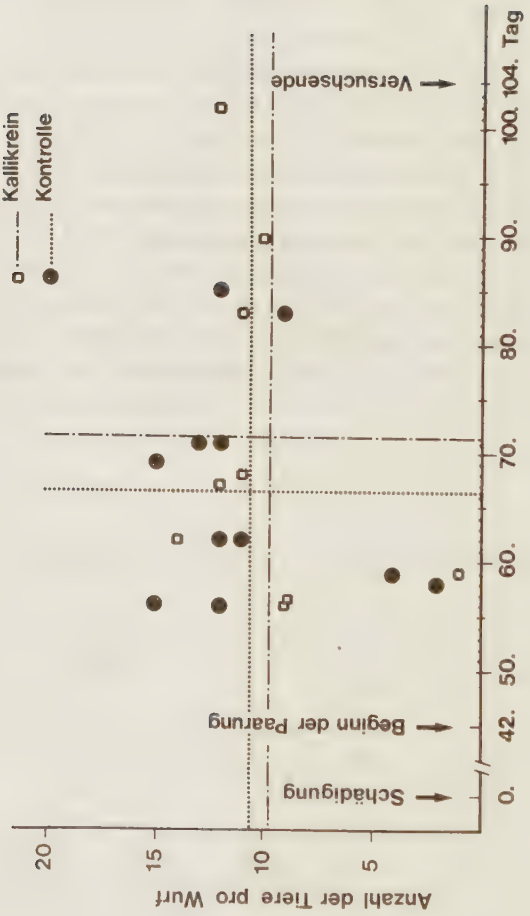

Abb. 4: Zeitpunkt der Wiedererlangung der Fertilität nach lokaler Wärmeschädigung der Hoden und Wurfgröße nach erster fertiler Paarung

3.2.4 Biochemische Parameter

3.2.4.1 Hemmkapazität von Seren juveniler, männlicher Ratten

Bestimmt wurde die Gesamt-Trypsin-Hemmkapazität in gepoolten Seren prämaturer, männlicher Ratten am 5., 15., 20. und 35. Lebenstag. Bereits die 5 Tage alte Ratte verfügt über eine hohe Hemmkapazität, die mit zunehmendem Alter deutlich ansteigt und am 35. Tag fast das Doppelte beträgt.
Folgende Werte (α_1-Antitrypsin mIU/ml Serum) wurden gefunden: 1475 mIU am 5., Tag, 1670 mIU am 15. Tag, 1950 mIU am 20. Tag und 2420 mIU am 35. Tag (Abb. 5).

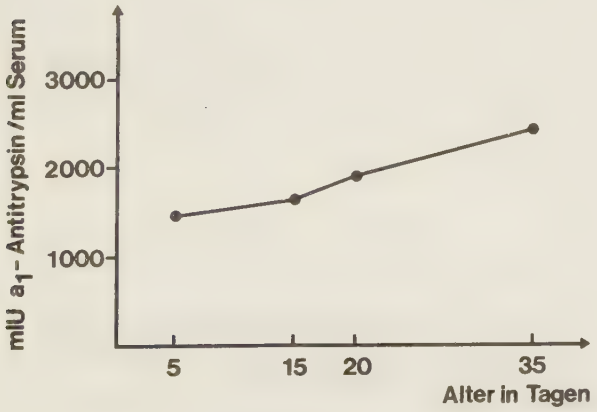

Abb. 5: Hemmkapazität gegen Kallikrein in Seren juveniler männlicher Ratten

3.2.4.2 Hemmung von Schweinepankreaskallikrein "in vitro" durch Seren juveniler, männlicher Ratten

Die Ergebnisse zeigen, daß Rattenserum "in vitro" zugesetztes Schweinepankreaskallikrein, hier 1 KE bzw. 0,1 KE/0,1 ml Serum bereits innerhalb weniger Minuten zu einem großen Teil zu hemmen vermag. In den Tab. 28 und 29 wird die Restaktivität des Schweinepankreaskallikreins in Prozent angegeben (1 % entspricht absolut 0,001 bzw. 0,01 KE im Testansatz). Sie wurde mit Hilfe des kombinierten BAEE/ADH-Tests bestimmt. Der starke Hemmeffekt innerhalb der ersten 5 - 15 Min. ist um so deutlicher, je älter die Tiere sind (Tab. 28 und 29, Abb. 6 und 7).
Nach einer Stunde ist die Aktivität auf ca. 50 % abgesunken. Nach 20 Stunden beträgt die Restaktivität noch ungefähr 4,5 bis maximal 17 %. Die Höhe dieser Restaktivität scheint von der Menge des zugesetzten Kallikreins abhängig zu sein. So weisen die Proben mit nur 0,1 KE/o,1 ml Serum eine 2 - 3 mal größere Aktivität auf als die mit 1 KE/0,1 ml Serum (Tab. 28 und 29).

Tab. 28: Hemmung von Schweinepankreaskallikrein durch Seren juveniler männlicher Ratten in einem Testansatz mit 1 Einheit Kallikrein. Angegeben wird die Restaktivität in Prozent

% Restaktivität, bestimmt nach:	Alter der Tiere in Tagen			
	5	15	20	35
5 – 15 Min.	83,5	93	–	45,5
1 Stunde	53	48	19,6	14,7
3 Stunden	31	21,8	–	13,5
20 Stunden	8,2	6,2	–	4,5

Tab. 29: Hemmung von Schweinepankreaskallikrein durch Seren juveniler männlicher Ratten in einem Testansatz mit 0,1 Einheit Kallikrein pro 0,1 ml Serum

% Restaktivität, bestimmt nach:	Alter der Tiere in Tagen			
	5	15	20	35
5 – 15 Min.	84	83	55	36
1 Stunde	35	50	25	28
3 Stunden	22,5	42	22	26
20 Stunden	13	15	10	17

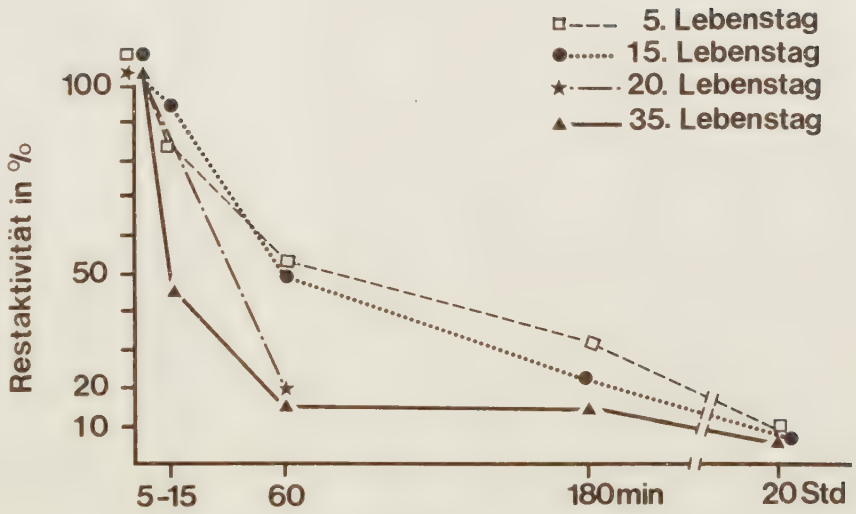

Abb. 6: Restaktivität von Schweinepankreaskallikrein nach Inkubation mit Seren 5, 15, 20 und 35 Tage alter Ratten.
- Testansatz: 1,0 KE/0,1 ml Serum; 100 Aktivität ≙ 1 KE; Bestimmung der Aktivität mit dem kombinierten BAEE/ADH-Test -

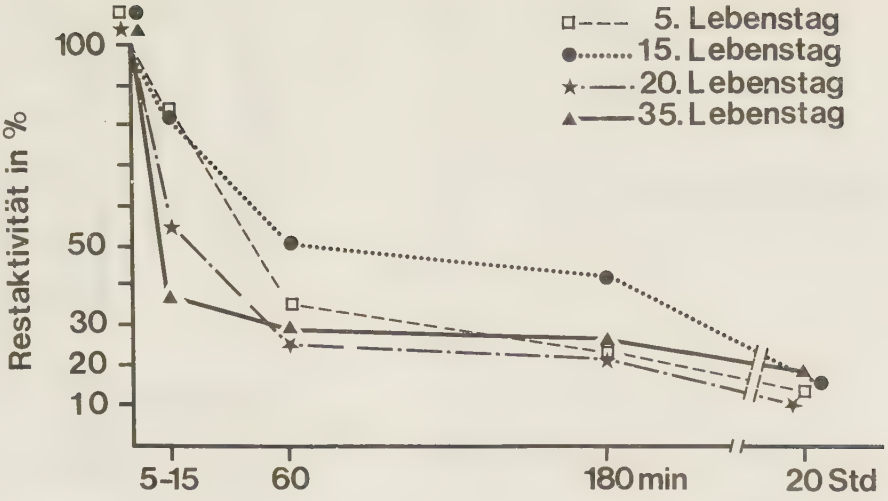

Abb. 7: Restaktivität von Schweinepankreaskallikrein nach Inkubation mit Seren 5, 15, 20 und 35 Tage alter Ratten
- Testansatz: 0,1 KE/0,1 ml Serum; 100 % Aktivität ≙ 0,1 KE; Bestimmung der Aktivität mit dem kombinierten BAEE/ADH-Test -

3.2.4.3 Einfluß einer einmaligen Applikation von Kallikrein auf die aus Rattenplasma freisetzbare Menge von Bradykinin

Die Nullwerte, die 15 Min. vor der Applikation bestimmt wurden, variierten von Tier zu Tier sehr stark.
Bei den Tieren, die 1000 KE/kg KG erhalten hatten, konnte nur bei einer einzigen Ratte ein Bradykininabfall beobtet werden. Bei diesem Tier war vorher eine experimentelle Hodenschädigung durchgeführt worden. Das zweite Tier mit experimenteller Hodenschädigung zeigte keine Reaktion. Eindeutige Unterschiede zwischen den Nullwerten und den nach der Kallikreinapplikation bestimmten Werten konnten dagegen bei allen Tieren beobachtet werden, die 10 000 KE/kg KG erhalten hatten, unabhängig davon, ob bei diesen Tieren eine Hodenschädigung vorgenommen worden war.
Subjektiv wurde bei diesen drei Tieren eine geringere Narkosetoleranz festgestellt. Alle Tiere erholten sich nur sehr langsam und waren über längere Zeit apathisch (Abb. 8 und 9).

Tab. 30: Einfluß einer einmaligen i.p. Injektion von 1000 und 10 000 E Schweinepankreaskallikrein pro kg KG auf die Bradykininfreisetzung aus Plasma adulter Ratten mit und ohne Hodenschädigung. Angegeben werden ng freisetzbares Bradykinin/ml Plasma

Zeitpunkt der Blutentnahme nach der Kallikreinapplikation	1000 KE/kg KG i.p.				10 000 KE/kg KG i.p.		
	mit Hodenschädigung		ohne Hodenschädigung		mit Hodenschädigung		ohne Hodenschädigung
	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6	Ratte 7
Nullwert	380	380	254	117	620	676	830
	317	380			620	676	761
5 Min.	317	317	254	117	608	304	579
10 Min.	–	317	317	–	608	483	507
30 Min.	442	254	439	–	355	304	254
60 Min.	351	254	254	254	338	–	–

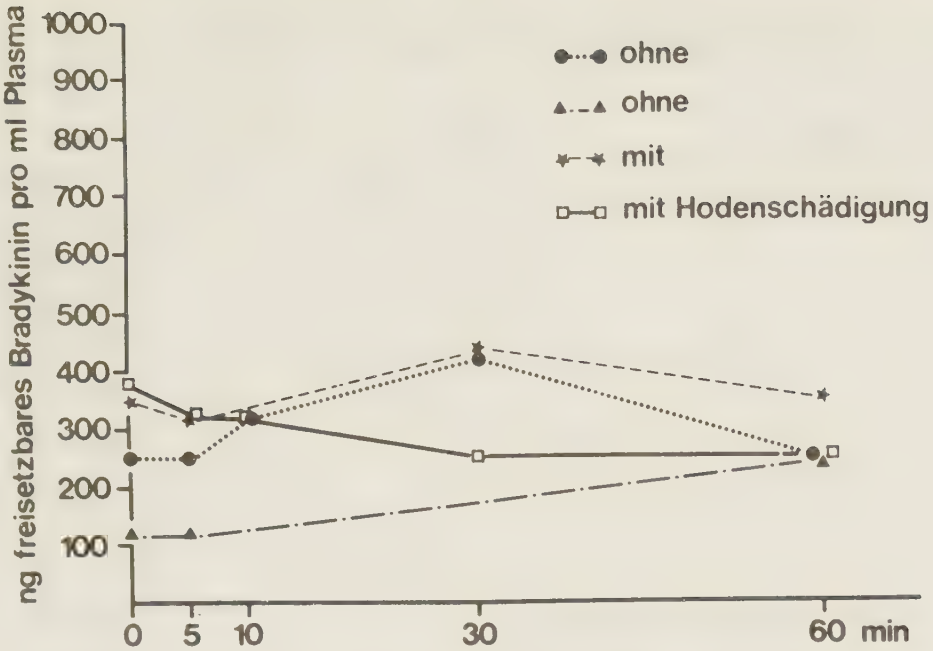

Abb. 8: Einfluß einer einmaligen i.p. Injektion von 10 000 E Kallikrein/kg KG auf die Bradykininfreisetzung aus Plasma von 4 adulten Ratten mit und ohne experimentell geschädigte Hoden

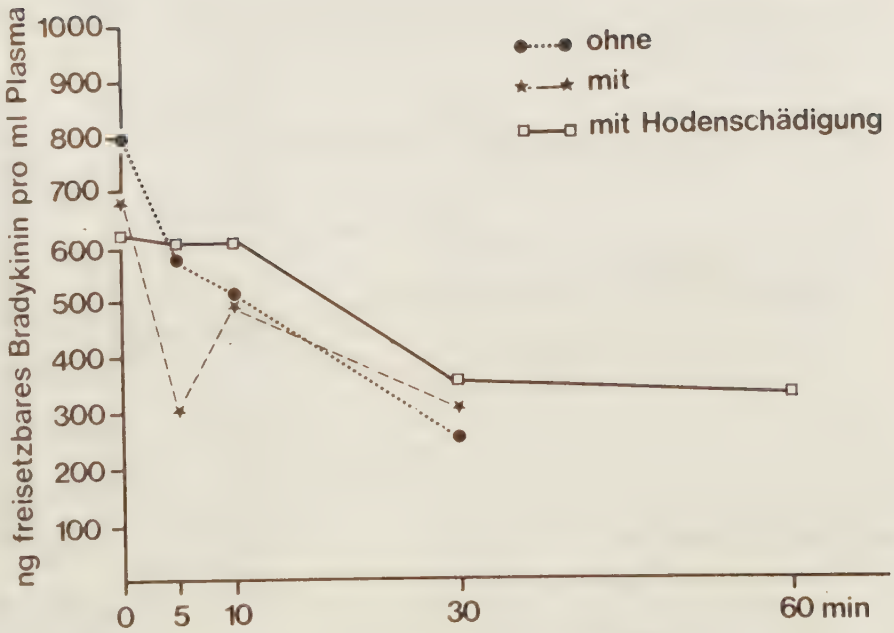

Abb. 9: Einfluß einer einmaligen i.p. Injektion von 10 000 E Kallikrein/kg KG auf die Bradykininfreisetzung aus Plasma von 3 adulten Ratten mit und ohne experimentell geschädigte Hoden

4. DISKUSSION

Die bisherigen Erfahrungen in der Humanmedizin mit Kallikrein und hier speziell Schweinepankreaskallikrein zur Therapie männlicher Fertilitätsstörungen haben positive Ansätze gezeigt. Über Angriffspunkt und Wirkungsweise dieser Substanz im Hoden liegen jedoch keine schlüssigen Angaben vor. In der vorliegenden Arbeit wurde am Rattenhoden der Einfluß von Schweinepankreaskallikrein auf die Spermatogenese prämaturer Tiere und die Regenerationsprozesse nach experimenteller Schädigung untersucht.

Bereits in den 50er Jahren wurde ein möglicher Einfluß des Kallikrein-Kinin-Systems auf weibliche und männliche Geschlechtsorgane beschrieben. Da es sich jedoch um klinische Einzelbeobachtungen handelte, ist die Aussagekraft dieser Beobachtungen beim Menschen beschränkt. Die einzige gesicherte experimentelle Untersuchung wurde von IGARASHI et al. (1962b) durchgeführt, der Frauen mit therapeutisch resistenter sekundärer Amenorrhoe oder habituellen anovulatorischen Zyklen behandelte und die Gonadotropinausschüttung im Harn nach Dauertropfinfusion von Padutin®*) bestimmte. Weitere experimentelle Untersuchungen liegen nur noch für die Ratte (IGARASHI et al., 1962a; WERLE et al., 1964) und für das Kaninchen (HARTENBACH, 1954) vor, die morphologisch eine stimulierende Wirkung auf Ovar-, Prostata- und Samenblasendrüsengewicht sowie Hypophysenfunktion belegen. Der Kallikreineffekt wurde durch eine Verbesserung der örtlichen Durchblutungsverhältnisse, verbunden mit einem erhöhten Substratangebot, durch eine Veränderung der vegetativen Lage des Gesamtorganismus oder durch eine Stimulierung des Hypophysen-Gonadensystems erklärt (FREY et al., 1953; FREY und HARTENBACH, 1953; HARTENBACH, 1954; IGARASHI et al., 1962a,b).

---

*) Padutin®, Fa. Bayer, Leverkusen

Erst durch die Feststellungen verschiedener Untersucher in den letzten fünf bis zehn Jahren, daß das Kallikrein-Kinin-System einen Einfluß auf Zellteilungs- und Regenerationsprozesse verschiedener Gewebe hat (PERRIS und WHITFIELD, 1969; WHITFIELD et al., 1970a; RIXON et al., 1971; ROHEN und PETERHOFF, 1973; MANDEL et al., 1973), wurde das Interesse am Kallikrein als mögliches Mittel zur Behandlung von Fertilitätsstörungen beim Mann wieder geweckt. Hinzu kam, daß andere Arbeiten erbracht hatten, daß das Kallikrein-Kinin-System auch physiologischerweise eine Rolle für die Reproduktion spielt. Dazu gehören der Nachweis einzelner Komponenten dieses Systems in weiblichen wie männlichen Genitalsekreten beim Menschen (FRITZ, 1975; PALM und FRITZ, 1975) und beim Tier (BHOOLA et al., 1961; MORIWAKI et al., 1975; HAENDLE et al., 1964). Weiterhin ist hier anzuführen, daß auch das Akrosin, ein wesentliches Enzym für die Befruchtung, in die Gruppe der Kininogenasen, also der kininliberierenden Enzyme eingeordnet wird (PALM und FRITZ, 1975). Andere experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, daß Kallikrein einen positiven Effekt auf die Cervixmucuspenetration von Spermien in vitro hat (WALLNER et al., 1975; SCHILL, 1975b; PALM und FRITZ, 1975).

Die erste Untersuchung über den Einfluß von Scheinepankreaskallikrein bei Männern mit Fertilitätsstörungen wurde von STÜTTGEN (1973) durchgeführt. Ihr folgten zahlreiche Arbeiten aus der Humanmedizin, die sich mit dem therapeutischen Effekt des Kallikrein (SCHILL, 1975a, b, c, d, f; SCHIRREN et al., 1975; FROMANTIN et al., 1975; ISHIGAMI und KAMIDONO, 1975) oder dem in vitro-Effekt auf Spermien (SCHILL und HABERLAND, 1974a; SCHILL et al., 1974; SCHILL 1975e; PALM et al., 1976; SCHIRREN, 1975) befaßten. Als Indikation wurden insbesondere Fälle von Oligo- und Asthenozoospermie sowie einige Fälle von Teratospermie angesehen. Der Behandlungserfolg wurde dabei an Veränderungen des Spermio-

gramms, vor allem an Motilität, Dichte und/oder Gesamtspermienzahl, Spermienmorphologie und -stoffwechsel beurteilt. Das Ejakulatvolumen scheint beim Menschen nicht beeinflußt zu werden (SCHILL, 1975a). Histologische Untersuchungen des Keimepithels wurden nicht beschrieben oder nur im Zusammenhang mit der Diagnosestellung erwähnt. Die vorliegenden Arbeiten ergeben zusammengefaßt bei einer Behandlung mit Kallikrein folgendes Bild:

- Bei Männern mit überdurchschnittlich guten Spermawerten eine zeitlich begrenzte Abnahme der Dichte,
- bei Männern mit physiologischem Spermiogramm keine Veränderungen,
- bei Patienten mit Oligozoospermie eine Zunahme der Dichte und der Gesamtspermienzahlen bei unverändertem Ejakulatvolumen,
- bei Patienten mit Asthenozoospermie eine deutliche Steigerung der Motilität,
- bei Fällen von Teratospermie einen erhöhten Prozentsatz normal konfigurierter Spermien.

Während die Stimulierung der Motilität bereits im Laufe der Therapie einsetzt und noch mehrere Monate danach besteht, erfolgt der Anstieg der Dichte bzw. der Gesamtspermienzahlen erst zwei bis drei oder fünf Monate nach Therapiebeginn (SCHILL, 1975a). Es handelt sich also hier nicht um einen kurzfristigen Effekt, sondern um einen verzögert eintretenden Erfolg, der auch nach Absetzen der Therapie noch vorhanden ist.

In vitro-Versuche haben gezeigt, daß Kallikrein über eine Kininfreisetzung die Motilität und den Stoffwechsel von Spermien kurzfristig zu stimulieren vermag. Als mögliche Wirkungsmechanismen für die Stimulierung der Motilität und

die Beeinflussung der Spermienzahlen werden unter anderem eine Beeinflussung von Transportmechanismen, Membranveränderungen, Verbesserung der Motilität über eine Stimulierung der Prostaglandinsynthese, mitogene Wirkung über Mediatoren wie Calcium und cAMP sowie eine Verbesserung örtlicher Durchblutungsverhältnisse diskutiert. Angriffspunkte für einen direkten Einfluß des Kallikrein bzw. Kinin könnten entweder die Spermatogenesezellen und/oder die Sertolizellen sein. Daß letztere sicher eine wichtige, wenn nicht entscheidende Rolle spielen, kann aus ihrer Bedeutung für den morphologischen Aufbau sowie für die physiologischen und pathologischen Vorgänge am Keimepithel geschlossen werden.

Eine Beeinflussung des Hypophysen-Gonadensystems, wie sie IGARASHI et al. (1962b) bei der Frau nachweisen konnten, oder eine Beeinflussung der Leydig-Zellen wird von den oben erwähnten Autoren nicht angenommen. Die Frage, ob auch ein Einfluß auf die Nebenhoden und die samenableitenden Organe durch Kallikrein vorhanden ist, ist ebenfalls noch ungeklärt.

Überraschenderweise liegen nur sehr wenige Arbeiten über den Effekt des Kallikrein beim Tier vor. LEIDL et al. (1975a) konnten weder eine Stimulierung der Motilität noch eine Zunahme der Dichte oder der Gesamtspermienzahlen beim Bullen beobachten. Eine Abnahme der Dichte zeigte sich dagegen bei einem Tier, das mit einer besonders hohen Dosis Kallikrein (3 x 1000 E pro Woche über 7 Wochen) behandelt wurde. Dieser Effekt trat 2 - 3 Wochen nach Versuchsbeginn auf. Ein Widerspruch zu den Ergebnissen aus der Humanmedizin besteht nicht, da es sich bei den Versuchsbullen um Tiere mit physiologischer Spermatogenese handelte. Bei drei "Problemstieren" einer Besamungsstation wurde von MÜLLER und BRANDL (1977) nach Kallikreinapplikation eine verbesserte Motilität nach Verdünnung des Spermas und ein er-

höhter Prozentsatz lebender Zellen nach Tiefgefrierung beobachtet. Dieser Therapieerfolg weist darauf hin, daß unter pathologischen Bedingungen vielleicht auch beim Bullen ein positiver Kallikreineffekt gegeben ist. Das geringe Patientenmaterial läßt eine weitere Überprüfung wünschenswert erscheinen.

Die beim Mann vorliegenden klinischen Beobachtungen einer positiven Beeinflussung von Fertilitätsstörungen mit Kallikrein waren der Anlaß, den Effekt dieser Substanz auf das Keimepithel experimentell zu untersuchen, und zwar sowohl bei physiologischer Spermatogenese als auch bei pathologischen Zuständen. Als Modell wurde die Spermatogenese der Ratte gewählt, da sie sehr gut erforscht ist und weil die kurze Entwicklungsdauer dieser Spezies erlaubt, alle spermatogenen Prozesse von der Geburt bis zur Geschlechtsreife einzubeziehen. Bei den eigenen Untersuchungen wurden zusätzlich zu den Germinativzellen noch andere Zellsysteme des Hodens, wie Stützzellen, Wandzellen und Interstitium berücksichtigt. Diese Zellsysteme sind eng mit dem physiologischen Ablauf der Spermatogenese verbunden, weisen aber andere Proliferationsmuster auf. Dies gilt besonders für die Stützzellen, die späteren Sertolizellen, auf deren Bedeutung schon hingewiesen wurde. Es wurde also versucht, die wichtigsten morphologischen Strukturen im Hoden zu erfassen, um eventuelle Einflüsse des Kallikrein auf die Spermatogenese interpretieren zu können.

WERLE und SCHMAL (1968) beschrieben, daß Rattenplasma große Mengen von Schweinepankreaskallikrein fast vollständig zu inaktivieren vermag, und daß es sich bei dem wirksamen Prinzip auf Grund des Hemmungsverlaufes um ein Enzym handeln sollte. MORIYA et al.(1962) gaben an, daß zu Rattenplasma zugesetztes Kallikrein vom Schwein innerhalb von 30 Minuten zu 100 % inaktiviert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb auch der Inhibitorgehalt für Trypsin, angegeben als α_1-Antitrypsin mIU/ml Serum, bei 5, 15, 20 und 35 Tage alten Ratten bestimmt. α_1-Antitrypsin ist im

menschlichen Serum als Progressiv-Antikallikrein identifiziert worden (FRITZ, 1978). Die 5 Tage alte Ratte hat bereits einen Inhibitorgehalt von ca. 1500 mIU/ml Serum. Der Wert steigt bis zum 35. Lebenstag auf ungefähr 2500 mIU/ml Serum. Darüber hinaus wurde mit Hilfe des kombinierten BAEE/ADH-Tests die Aktivität von Schweinepankreaskallikrein in Rattenseren 5 Minuten bis 20 Stunden nach Zugabe ermittelt. Anhand der eigenen Ergebnisse kann gesagt werden, daß generell die Aktivität des Kallikrein in Übereinstimmung mit den Angaben von WERLE und SCHMAL (1968) und MORIYA et al. (1962) in kurzer Zeit abnimmt. Die verbleibende Restaktivität war sowohl von der Höhe des Kallikreinzusatzes als auch vom Alter der Tiere abhängig. So war beispielsweise nach einem Zusatz von 1 KE/0,1 ml Serum von 15 Tage alten Ratten nach 3 Stunden noch eine Aktivität von 0,21 KE/0,1 ml vorhanden, während sie im Serum 35 Tage alter Ratten auf 0,13 KE/0,1 ml absank. Die Restaktivitäten nach 20 Stunden betrugen 0,06 bzw. noch 0,04 KE/0,1 ml Serum. Aus diesen Ergebnissen über die Bestimmung der Restaktivität kann gefolgert werden, daß bei den verwendeten Dosierungen ein ausreichender Kallikreinspiegel im Plasma über eine genügend lange Zeit zur Wirkung kommen kann.

FASCIOLO und HALVORSEN (1964) haben in ihrer Arbeit angegeben, daß injiziertes Schweinepankreaskallikrein (20 KE) bei der Ratte keinen Blutdruckabfall bedingt bzw. kein Kallidin aus dem Kallidinogen des Rattenplasmas freisetzen kann. In unseren Versuchen wurde jedoch nach Applikation von 10 000 KE/kg Körpergewicht ein eindeutiger Kininogenverbrauch registriert, der nur über eine Kininfreisetzung abgelaufen sein kann. Außerdem konnte subjektiv eine geringere Narkosetoleranz - die Blutentnahme wurde in Narkose vorgenommen - festgestellt werden, und die Tiere erholten sich nur langsam. Bei einer Dosierung von 1000 KE/kg Körpergewicht konnte dagegen weder ein Kininabfall beobachtet werden, noch war subjektiv eine negative Reaktion auf die Behandlung hin zu erkennen. Die eigenen Beobachtungen werden deshalb

dahingehend interpretiert, daß Schweinepankreaskallikrein grundsätzlich in der Lage ist, Kinin im Rattenblut freizusetzen.
Das negative Ergebnis bei der Dosierung von 1000 KE/kg Körpergewicht ist eventuell auf die geringe Empfindlichkeit des Testsystems zurückzuführen. Dies war auch die Ursache, für unsere Versuche extrem hohe Dosierungen zu wählen. Nach der Überprüfung des Inhibitorgehaltes von Rattenseren und dem indirekten Nachweis einer Kininfreisetzung durch Schweinepankreaskallikrein wurde die Ratte auch von dieser Sicht her als brauchbares Modell angesehen. Es ist erstaunlich, daß bisher derartige Versuche nicht vorgenommen wurden, obwohl ein Großteil der experimentellen Erkenntnisse der Kallikreineffekte,nicht nur auf die Gonaden, sondern auch für eine ganze Reihe anderer Organe an dieser Tierart gewonnen wurde.

Für die Untersuchungen über einen Effekt von Kallikrein bzw. dem von ihm freigesetzten Kinin auf das Keimepithel, nach einmaliger Applikation, erschien der Übergang von der postnatalen Präspermatogenese zur frühen Spermatogenese um den 4. bis 6. Lebenstag am geeignetsten. Am 4. Tag p.n. nehmen die T_1-Präspermatogonien nach ihrer langen Interphase die mitotische Aktivität wieder auf, das heißt sie treten zu diesem Zeitpunkt in die S-Phase ein (HILSCHER et al., 1974a). Gleichzeitig erreicht die "physiologische" Degeneration dieser Zellen, die nach der Geburt einsetzt, ihren Höhepunkt (HILSCHER und HILSCHER, 1976). Durch die Teilung der T_1-Prospermatogonien zwischen dem 4. und 6. Lebenstag entstehen die T_2-Prospermatogonien, die direkten Vorläufer der späteren A- oder Stammspermatogonien (HILSCHER et al., 1976). Fünf Tage p.n. besteht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen Zellen, die in die S-Phase ein- und austreten (HILSCHER et al., 1972b; HILSCHER et al., 1974a). Es bietet sich hier also die Möglichkeit, neben den Teilungsprozessen auch die Degenerationsphase der Präspermatogonien zu erfassen. Eine eventuell mögliche Verhinderung oder Verzögerung der Degeneration durch Kallikrein müßte dann in einer größeren Anzahl von Geschlechtszellen zum Ausdruck kommen. In

diesem Versuch erhielten Ratten 96, 119 und 120 Stunden nach ihrer Geburt entweder 1, 10 oder 100 E Kallikrein pro kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Alle Tiere erhielten 120 Stunden p.n. 3H-markiertes Thymidin. Eine Stunde später wurden sie getötet. Es hat sich gezeigt, daß die Behandlung keinen Einfluß auf die durchschnittliche Anzahl von Geschlechtszellen, Stützzellen oder Wandzellen hat. Dasselbe gilt auch für die Mitoseindices der Stütz- und Wandzellen. Auf Grund der geringen Anzahl von Geschlechtszellen (ca. 1 Zelle/Tubulusquerschnitt) war die Bestimmung eines Mitoseindex für diese Zellen nicht sinnvoll. Die Ergebnisse der histologischen Auswertung geben keine Hinweise auf eine Beeinflussung der mitotischen Prozesse. Auch die Degeneration der Prospermatogonien war nicht nachweisbar beeinflußt. Dagegen ergab die Auswertung der Autoradiogramme, daß der prozentuale Anteil markierter Geschlechts- und Stützzellen nach Applikation von 1 Einheit Kallikrein pro kg KG 0 und 24 bzw. nur 0 Stunden vor der 3H-Thymidinapplikation signifikant anstieg. Es war also eine deutlich erhöhte 3H-Thymidin-Inkorporation in Abhängigkeit von der Dosierung zu erkennen.

Daß nicht alle Differenzen statistisch abgesichert werden konnten, muß zu einem gewissen Teil auf die relativ geringe Anzahl Tiere pro Gruppe zurückgeführt werden (n = 4 oder 5); MATTHIESSEN und ROHEN (1975) berichten von einer erhöhten Gesamtradioaktivität in Hoden und Nebenhoden sowie von einer erhöhten Radioaktivität der extrahierten DNS nach Behandlung mit Kallikrein (25 E/100 g KG). Der photometrisch bestimmte DNS-Gehalt im Hoden unterschied sich dagegen nicht signifikant. Die Autoren halten eine Stimulierung der DNS-Synthese für

wahrscheinlich (MATTHIESSEN und ROHEN, 1975). Histologische Untersuchungen wurden von ihnen nicht durchgeführt. Bei den eigenen Ergebnissen war außer einer intensiveren Markierung der DNS morphologisch kein weiterer Hinweis für eine erhöhte Aktivität der Zellen vorhanden. Auch 24 Stunden nach der Kallikreinapplikation waren keine histologischen Merkmale für eine Stimulierung der Mitosen vorhanden. Der verstärkte Einbau von 3H-markiertem Thymidin nach Kallikreinapplikation wird als Stimulierung der DNS-Synthese interpretiert, ohne daß es gelang, diesen Effekt zusätzlich morphologisch zu belegen.

In den folgenden Versuchen wurde der Langzeiteffekt von Kallikrein auf die frühe Spermatogenese untersucht. Während im ersten Versuch ein wenig gereinigtes Versuchspräparat, "Kallikrein" Bay d 7687, verwendet wurde, erfolgte die Behandlung in den anderen Fällen mit hochgereinigtem Schweinepankreaskallikrein. Verwendet wurden Dosierungen von 1, 5, 10 E/kg KG im ersten Versuch bzw. 1, 5, 10 und 100 sowie 100 und 1000 E Kallikrein in den folgenden Versuchen. Es wurde versucht, durch eine unterschiedliche Versuchsdauer die gesamte Entwicklung der frühen Spermatogenese zu erfassen. Die ersten beiden Versuche wurden am 5. Lebenstag begonnen, also gleichzeitig mit dem Beginn der frühen Spermatogenese. Die Behandlung mit Kallikrein erfolgte täglich bis zum 20. Lebenstag. Zwischen dem 5. und 20. Lebenstag der Ratte kommt es sowohl zum Anlaufen der spermatogenen Prozesse als auch zur Bildung des Stammzellreservoirs, das später die Voraussetzung für die kontinuierliche Erneuerung des Germinativums ist. Weiterhin stellen die Stützzellen zwischen dem 15. und 18. Lebenstag ihre Teilungsaktivität ein. Ein großer Teil von ihnen degeneriert, der Rest wandelt sich in Sertolizellen um. Im ersten Versuch erfolgte die Tötung der Tiere erst im Anschluß an eine 15-tägige Wartezeit, also 35 Tage p.n.. Zu diesem Zeitpunkt bietet

das histologische Präparat schon das typische Bild der Spermatogenese der adulten Ratte, jedoch ohne reife Spermien. Einzelne Phasen können gut angesprochen werden. Bis zu dem erwähnten Entwicklungsstadium entspricht die Spermatogenese auch quantitativ der von maturen Tieren.
Im zweiten Versuch wurde ein Teil der Tiere unmittelbar nach Ende der Kallikreinapplikation getötet. Die anderen Ratten blieben bis zum 35. Lebenstag im Versuch. Dadurch sollten Effekte erfaßt werden, die möglicherweise nur am Ende der Applikation oder erst zwei Wochen nach Abschluß der Medikation zu erkennen sind. Hierbei ist an eine Verzögerung der Stützzelldegeneration oder an eine Beeinflussung der ersten Spermatogenesezellgeneration, einer Art "Vorhut" der Spermatogenese, zu denken. Es handelt sich hier um Zellen, die zwischen dem 7. und 15. Tag p.n. auftreten, deren Entwicklung anscheinend schneller abläuft, und die später meist degenerieren (CLERMONT und PEREY, 1957; HILSCHER und MAKOSKI, 1968; HILSCHER und HILSCHER, 1976). Die Bedeutung dieser Zellen ist unklar.
Im letzten Versuch wurde von der Überlegung ausgegangen, daß eine Beeinflussung der spermatogenen Prozesse unter Umständen auch durch eine noch während der postnatalen Präspermatogenese einsetzenden Behandlung möglich sein könnte, die eventuell in einer größeren Zahl von A-Spermatogonien resultieren oder zu einer zeitlichen Verschiebung im Spermatogeneseablauf führen könnte. Zusätzlich wurde der Behandlungszeitraum erweitert. Die Tiere wurden jetzt vom 1. bis 20., 1. bis 25. bzw. 1. bis 35. Lebenstag behandelt und sofort danach getötet.
Als Kriterium für eine Auswirkung auf den Gesamtorganismus wurden die Körpergewichte der Tiere herangezogen. Sie unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt und in keinem Versuch signifikant von denen der Kontrolltiere. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Angaben von IGARASHI et al. (1962b), die beim infantilen männlichen Tier nach Kallikreinverabrei-

chung keine Veränderung der Körpergewichte beobachten konnten. WERLE et al.(1964) beschrieben eine deutliche Zunahme der Körpergewichte nach Kallikreinapplikation am Ende der Wachstumsphase, also bei ca. 120 g schweren Ratten. Dieser Zeitpunkt wurde bei den hier durchgeführten Versuchen nicht erfaßt.

Neben dem Körpergewicht wurden jeweils die Gewichte von Hoden, Nebenhoden und Samenblasendrüsen bestimmt. Varianzanalytisch ergab sich für die Hodengewichte der 20 Tage alten Ratten, die vom 1. Lebenstag an täglich Kallikrein appliziert bekamen, ein signifikanter Unterschied ($P \leq 0{,}01$). Das Hodengewicht der Kontrollratten betrug 142 mg, während es bei der Gruppe mit 100 E Kallikrein 151 mg und bei 1000 E Kallikrein 148 mg betrug. Eine Art Dosiswirkungskurve war also nicht zu beobachten. Eine Abtestung der Differenzen nach Scheffé erbrachte keinen Hinweis für signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und den Kontrollgruppen (beide Differenzen $P \geq 0{,}05$). Eine ähnliche Situation zeigte sich bei den Nebenhodengewichten 20 Tage alter Ratten, die vom 5. bis 20. Tag Kallikrein erhielten. Da bei diesen beiden Gruppen zwar verschiedene Dosierungen eingesetzt worden waren, die niedrigste und höchste Dosierung sich jedoch überlappten, ansonsten nur der Beginn der Kallikreinapplikation variierte, werden diese Effekte als versuchsbedingt, aber nicht spezifisch für das Kallikrein angesehen. Für diese Erklärung sprechen auch die Beobachtungen von IGARASHI et al. (1962a) und WERLE et al. (1964), die weder eine Stimulierung der Hoden noch der Nebenhoden beschrieben.

IGARASHI et al. (1962a) gaben in ihrer Arbeit an, daß das Gewicht von Prostata und Samenblasendrüsen durch Kallikrein erhöht wurde. Sie führten dies auf eine Stimulierung des Hypophysen-Gonadensystems zurück. WERLE et al. (1964) beschrieben ebenfalls eine Gewichtszunahme von Prostata und Samenblasendrüsen, die ihrer Meinung nach durch eine erhöhte Durchblutung bedingt war. Sie belegten diese Ansicht durch

Verabreichung von Natriumacid, das den gleichen Effekt erzeugt, mit Kallikrein aber nur dessen blutdrucksenkende Wirkung gemeinsam hat. Bei den eigenen Versuchen war nur einmal, und zwar nach Gabe von 100 E Kallikrein/kg Körpergewicht vom 1. bis 35. Tag, eine signifikante Beeinflussung der Samenblasendrüsengewichte zu ermitteln. Das Gewicht lag jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen von IGARASHI et al. (1962a) und WERLE et al. (1964) niedriger als bei den Kontrolltieren. Auch hierin wurde wegen der Einmaligkeit des Phänomens und der breit angelegten Versuchsanordnung kein spezifischer Effekt gesehen.

Die histologische Untersuchung der Hoden, bei der die A-Spermatogonien und die pachytänen Spermatozyten der Phase X des Keimepithelzyklus nach LEBLOND und CLERMONT (1952a, b) sowie die Stütz- bzw. Sertolizellen bestimmt wurden, ergab keinen Hinweis für eine Stimulierung der Spermatogenese durch Kallikrein. Quantitative Auswertungen bestimmter Zellen histologischer Präparate von Hoden unterliegen auch bei sorgfältigem und möglichst 'objektivem' Vorgehen einer erheblichen Fehlerquelle. Das Miteinbeziehen oder Negieren von Zellanschnitten, die Entscheidung, bestimmte Tubulusquerschnitte mit zu erfassen oder wegen Besonderheiten im Schnitt zu eliminieren, oder ähnliche Faktoren mögen dazu beitragen. Der Untersucher kann sich bei der anstrengenden und lange Zeit in Anspruch nehmenden Auswertung unter Umständen einem gewissen Wandel seines eigenen Standards im Sinne einer bestimmten Tendenz nicht völlig entziehen. Die Aufteilung der Auswertung auf mehrere Personen würde zwar diese Situation bessern, bringt aber eine weitere Fehlerquelle durch unterschiedliche subjektive Ansichten. Die quantitative Auswertung histologischer Präparate erfolgte deshalb in dieser Arbeit in einer Art "doppelten Blindversuchs". Die Objektträger waren kodiert und die Gruppenzugehörigkeit dem Untersucher unbekannt. Die Beurteilung wurde willkürlich vorgenommen, also nicht gruppenweise. Dieser Modus dürfte auch die Ursache sein, daß früher

erwähnte Unterschiede bei der Stützzelldegeneration nach Kallikreinapplikation, bei der die Zellzählung noch gruppenweise erfolgte (KLEEBERG et al., 1975) in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnten.
Die Bestimmung des Tubulusdurchmessers ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen. Dieser Parameter gilt als sicheres Kriterium für die spermatogene Aktivität des Germinativums (IBACH et al., 1976).
In einem Versuch, und zwar bei 20 Tage alten Tieren, wurde der prozentuale Anteil des Germinativums bestimmt. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen. ROHEN und BUSCHHÜTER (1975) konnten ebenfalls keine Veränderung bezüglich der Anzahl der Spermatogenesezellen nach Kallikreingaben nachweisen. Sie beobachteten jedoch eine signifikante Flächen- und Volumenzunahme bei den Sertolizellen, die auf eine Stimulierung des Stoffwechsels dieser Zellen schließen lassen.

Eine Vorverlegung des Beginns der Spermatogenese und der ersten Differenzierungsvorgänge um etwa einen Tag beschrieben ROHEN und SIUTTMANN (1977). Anzeichen für eine derartige zeitliche Beeinflussung der spermatogenen Prozesse wurden im Rahmen der eigenen Untersuchungen bei den 20, 25 und 35 Tage alten Ratten nicht gefunden.

Abschließend wurde noch der Einfluß von Kallikrein auf die Regeneration des reversibel geschädigten Keimepithels untersucht. 7 und 21 Tage nach der Schädigung zeigten Hoden- und Nebenhodengewichte keinen Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren. Der histologische Befund ließ darauf schließen, daß die experimentelle Schädigung der Spermatogenese bei allen Tieren gleichartige Auswirkungen hervorrief. Dies wurde belegt durch den Beginn und den Grad der Regenerationsprozesse und die Größe der Tubulusdurchmesser. Die Samenblasendrüsengewichte zeigten in allen Gruppen durchgehend physiologische Werte.

Die restlichen Tiere wurden bis zum 42. Tag weiterbehandelt und dann mit jeweils einem fertilen Weibchen gepaart. 104 Tage nach der Schädigung wurden alle Tiere getötet. Auch bei diesen Tieren konnte kein Unterschied zwischen behandelten und nichtbehandelten, hinsichlich der Nebenhoden-, Samenblasendrüsen- und Hodengewichte beobachtet werden. Ebensowenig ergaben sich Unterschiede beim Zeitpunkt des Wiederauftretens der Fertilität und bei den Wurfgrößen. In Übereinstimmung damit waren die histologischen Befunde über die Spermatogenese und Tubulusdurchmesser. Keines der erfaßten Merkmale ließ Unterschiede erkennen. Das hier gewählte Modell der experimentellen Hodenschädigung ergab keinen Hinweis auf eine irgendwie geartete Beeinflussung der Regenerationsvorgänge.

Schlußfolgerung:
In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, die Entwicklungsvorgänge am präpubertären Rattenhoden oder die Regenerationsvorgänge nach experimenteller Schädigung des Germinativums der adulten Ratten durch Kallikreinapplikation morphologisch nachweisbar zu beeinflussen. Die bei der 5 Tage alten Ratte beobachtete Stimulierung der 3H-Thymidin-Inkorporation weist auf eine Stimulierung der DNS-Synthese hin. Deren Bedeutung bzw. Auswirkung auf die Spermatogenese konnte durch Versuchsansätze, die die Samenbildungsprozesse von der Geburt bis zum maturen Tier umfaßten, nicht geklärt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Am Modell der Ratte wurde der Einfluß von Kallikrein auf die Spermatogenese während des präpuberalen Entwicklungsstadiums sowie auf die Regenerationsfähigkeit des experimentell geschädigten Keimepithels maturer Ratten untersucht.

Die Versuche wurden an Sprague-Dawley- und Wistarratten durchgeführt. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 1 oder 5 Tage bzw. bei der Hodenschädigung 70 - 80 Tage alt. Die Hodenschädigung erfolgte durch lokale Wärmeapplikation. Für die Untersuchungen standen ein Kallikreinversuchspräparat mit der Bezeichnung Bay d 7687 und hochgereinigtes Schweinepankreaskallikrein zur Verfügung. Als Vehicel und als Placebo für die Kontrollen diente physiologische Kochsalzlösung. Die Applikation erfolgte entweder subcutan oder intraperitoneal.

Der Einfluß einer einmaligen Kallikreininjektion wurde am Keimepithel 5 Tage alter Ratten untersucht, die 1, 10 und 100 KE/kg KG (Kallikreineinheiten pro Kilogramm Körpergewicht) 1, 2 und 25 Stunden vor der Tötung erhielten. 1 Stunde vor der Tötung wurde allen Tieren ^{3}H-Thymidin appliziert. Zur Abklärung des Effektes einer Dauermedikation auf das Keimepithel der präpubertären Ratte wurde ab dem 1. oder 5. Lebenstag täglich Kallikrein in Dosierungen von 1, 5, 10, 100 bis zu 1000 KE/kg KG über mindestens 14 und maximal 35 Tage appliziert. Des weiteren wurde untersucht, ob die Regenerationsfähigkeit eines experimentell geschädigten Germinativums durch Langzeitmedikation mit 100 KE/kg KG vom 1. bis 42. Tag nach der Schädigung beeinflußt werden kann. Ein Teil der Tiere wurde am 7. und 21. Tag nach der Schädigung getötet. Die restlichen Tiere wurden vom 42. bis 104. Tag nach der lokalen Wärmeapplikation mit fertilen Weibchen verpaart und am 104. Tag getötet.

Als Kriterien wurden herangezogen: Körpergewicht und Gewicht von Hoden, Nebenhoden und Samenblasendrüse, durchschnittliche Anzahl von Geschlechts-, Stütz- und Wandzellen pro Tubulus, Mitoseindex, 3H-Thymidin-Inkorporation, Tubulusdurchmesser und prozentualer Anteil des Germinativums (Bouinfixierung, Paraffineinbettung, HE-Färbung, Autoradiographie nach Dipping-Methode).

Nach einmaliger Kallikreinapplikation konnte eine gesteigerte 3H-Thymidin-Inkorporation beobachtet werden. Dagegen wurde unabhängig von Dosierung, Beginn, Dauer und Art der Applikation weder ein Einfluß auf die Körper- und Organgewichte noch auf die Spermatogenese der präpubertären Tiere festgestellt. Die Regenerationsfähigkeit des Keimepithels postpubertärer Tiere konnte durch die Kallikreinmedikation, gemessen an der spermatogenen Aktivität und an der im Paarungsversuch überprüften Fertilität der Tiere, nicht beeinflußt werden.

Die erhöhte 3H-Thymidin-Inkorporation nach einmaliger Gabe von Kallikrein weist auf eine Beeinflussung der DNS-Synthese hin, ohne daß jedoch eine nachhaltige Beeinflussung von Zellteilungsprozessen während der Spermatogenese des präpubertären Tieres oder der Regenerationsvorgänge nachzuweisen war.

SUMMARY

The rat was chosen for the research on the effect of Kallikrein on spermatogenesis during the prepuberal period of development and on regeneration capacity of experimentally injured germinal epithelium of mature rats.

For all experiments Sprague-Dawley- and Wistarrats were used. At the beginning of the experiment the animals were one to five days old, in the one case, and in the experiment involving trauma to the testis 70 to 80 days old. The injury to the testes resulted from local heat application. 'Kallikrein' Bay d 7687 and highly purified hog pancreatic Kallikrein were used. Physiological saline was used as solvent and placebo. The injections were either subcutanous or intraperitoneal.

The influence of a single Kallikrein injection was examined on the germinal epithelium of 5 days old rats. The animals received 1, 10 and 100 KE/kg body weight (Einheiten Kallikrein/kg body weight) 1, 2 or 25 hours before being killed.
All rats received 3H-Thymidine one hour before being killed.
To determine the effect of long term application on the germinal epithelium of prepuberal rats, starting on the first or the fifth day after birth, daily applications of Kallikrein in amounts of 1, 5, 10, 100 up to 1000 KE/kg of body weight were administered for periods of 14 up to 35 days. Moreover, research was carried out to determine whether the capacity for regeneration of experimentally injured germinal epithelium could be influenced by long period application of 100 KE/kg of body weight from the first to the 42nd day after imposing injury. Some of the animals were killed on the 7th day after injury, some on the 21st day. The remaining animals were brought together

with fertile females in the period from 42nd to the 104th day after local application of warmth.

For evaluation were taken: body and organ weights - testes, epididymes and seminal vesicles - mean number of germ cells, supporting cells and tubule wall cells per tubule cross section, mitotic index, 3H-Thymidine-incorporation, tubule diameter and percentage of germinal epithelium (Bouinfixation, embedding in paraffin, haematoxylin eosin-staining, autoradiography by dipping-method.

After a single Kallikrein application an increased 3H-Thymidine-incorporation was observed. But independent of dosage, length and type of application no influence on body and organ weight as well as spermatogenesis of prepuberal rats could be established. The regeneration capacity of postpuberal males based on spermatogenetic activity and the animals' fertility in a mating experiment.

The increased 3H-Thymidine-incorporation after a single dose of Kallikrein points to an influence on DNA-synthesis, but there was no proof of a lasting influence on cell division processes during spermatogenesis of the prepuberal animal or on regeneration processes.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ABBATIELLO, E.R., KAMINSKY, M. and WEISBROTH, S. (1976)
The effect of prostaglandins $F_{1\alpha}$ and $F_{2\alpha}$ on spermatogenesis.
Int.J.Fert. 21, 82-88

ADAM, J., SCHAF, J.-H. und ENKE, H. (1971)
Methoden der statistischen Analyse in Medizin und Biologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

AUMÜLLER, G., SCHENCK, B. and NEUMANN, F. (1975)
Fine structure of monkey (Macaca mulatta) sertoli cells after treatment with cyproterone.
Andrologia 7, 317-328

AUSTEN, K.F., SPRAGG, J., SCHREIBER, A. and KAPLAN, A. (1972)
Activation of components of the human plasma kinin system.
Abstracts of Invited Presentation, Vth Int.Cong. Pharmacol., San Francisco, July 23-28, p. 182

BAHNER, F. und SCHWARZ, G. (1959)
Experimentelle Pubertas praecox bei Ratten durch Testosteron.
Acta endocr. 30, 574-584

BARR, A.E., MOORE, D.J. and PAULSEN, C.A. (1971)
Germinal cell loss during human spermatogenesis.
J. Reprod. Fert. 25, 75-80

BAWA, S.R., KANWAR, K.C. and SINGAL, P.K. (1971)
Unilateral hyperthermic shocks to rat testis.
J. Reprod. Fert. 25, 271-273

BEAUMONT, H.M. and MANDL, A.M. (1963)
A quantitative study of primordial germ cells in the male rat.
J. Embryol. Exptl. Morphol. 11, 715-740

BERGMEYER, H.U. (1974)
Methoden der Enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Bd. I, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

BHOOLA, K.D., MORLEY, J. and SCHACHTER, M. (1961)
Kinin-releasing enzyme in the accessory sex glands of the guinea pig.
J. Physiol. 159, 34-35

BLANDAU, R.J. (1963)
Observations on the movement of the living primordial germ cells in the mouse.
Fert.Ster. 14, 482-489

BÖRSCH, G. (1975)
Die hormonale Regulation der Gonadenfunktion des Mannes.
Der Hautarzt 26, 239-245

BÖTTGER, I. und FUNCKE, H.J. (1978)
Bradykinin und Unterarmstoffwechsel. Hemmung der endogenen Prostaglandinsynthese.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 359, 369-378

BOISSONNAS, R.A., GUTTMANN, S. et JAQUENOUD, P.-A. (1960)
Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-seryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-arginine, un nonpeptide présentant les propriétés de la bradykinine.
Helv. chim. Acta 43, 1349
(zit. nach FREY et al., 1968)

BOWLER, K. (1967)
The effect of repeated temperature applications to testes on fertility in male rats.
J. Reprod. Fert. 14, 171-173

BOWLER, K. (1972)
The effect of repeated heat on spermiogenesis in the rat: a histological study.
J. Reprod. Fert. 28, 325-333

BUSTOS-OBREGON, E., COUROT, M., FLECHON, J.E., HOCHEREAU-deREVIERS, M.T. and HOLSTEIN, A.F. (1975)
Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man.
Andrologia 7, 141-163

BYGDEMAN, M., FREDERICSSON, B., SVANBORK, K. and SAMUELSSON, B. (1970)
The relation between fertility and prostaglandin content of seminal fluid in man.
Fert. Ster. 21, 622-629

DeCARVALHO, B.F. (1971)
Studies on the Kinin-forming enzyme (Kininogenin) of rat kidney.
In: Kidney Hormones, ed. by J.W. Fischer, Acad. Press Inc., London - New York 1971, 585-601

CHOWDHURY, A.K. and STEINBERGER, E. (1964)
A quantitative study on the effect of heat on germinal epithelium of rat testes.
Am. J. Anat. 115, 509-524

CLEGG, E.J. (1963)
Studies on artificial cryptorchidism. Degenerative and regenerative changes in the germinal epithelium of the rat testis.
J. Endocr. 27, 241-251

CLERMONT, Y. (1962)
Quantitative analysis of spermatogenesis of rat: A revised model for the renewal of spermatogenesis.
Am. J. Anat. 111, 111-129

CLERMONT, Y. (1966)
Renewal of spermatogonia in man.
Am. J. Anat. 118, 509-524

CLERMONT, Y. (1972)
Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal.
Phys. Rev. 52, 198-236

CLERMONT, Y. and BUSTOS-OBREGON, E. (1968)
Reexamination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto".
Am. J. Anat. 122, 237-248

CLERMONT, Y. and HARVEY, S.C. (1965)
Duration of the seminiferous epithelium of normal hypophysectomised and hypophysectomised-hormon treated albino rats.
Endocrinology 76, 80-89

CLERMONT, Y. and HERMO, L. (1975)
Spermatogonial stem cells in the albino rat.
Am. J. Anat. 142, 159-176

CLERMONT, Y. and HUCKINS, C. (1961)
Microscopic anatomy of the sex cords and seminiferous tubules in growing and adult male albino rats.
Am. J. Anat. 108, 78-98

CLERMONT, Y. and MAUGER, A. (1974)
Effect of a spermatogonial chalone on the growing rat testis.
Anat. Rec. 178, 330 (Abstract)

CLERMONT, Y. and MAUGER, A. (1976)
Effect of a spermatogonial chalone on the growing rat testis.
Cell Tiss. Kin. 9, 99-104

CLERMONT, Y. and PEREY, B. (1957)
Quantitative study of the population of the seminiferous tubules in immature rats.
Am. J. Anat. 100, 241-268

CLERMONT, Y. and TROTT, M. (1969)
Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of H-3-Thymidine and radioautography.
Fert. Ster. 20, 805-817

CLERMONT, Y., LEBLOND, C.P. et MESSIER, B. (1959)
Durée du cycle de l'épithélium séminal du rat.
Arch. Anat. micr. Morph. exp. 48, 37-56

COCHETT, T.K., DOUGHERTY, K.A. and ABRAHAM, M.S. (1976)
Caffeine, Theophylline and human sperm motility.
Fert. Steril. 27, 541-544

COLLINS, P. and LACY, D. (1969)
Studies on the structure and function of the mammalian testis. II. Cytological and histochemical observations on the testis of the rat after a single exposure to heat applied for different lengths of time.
Proc. Roy. Soc. B 172, 17-38

COUROT, M., HOCHEREAU-deREVIERS, M.T. and ORTAVANT, R. (1970)
Spermatogenesis.
In: The Testis; ed. by Johnson, A.D., Gomes, W.R. and Vandemark, N.L., Academic Press New York and London, Vol. I, p. 339-432

CROXATTO, H.R., HUIDOBRO, F., ROJAS, M., ROBLERO, J. and ALBERTINI, R. (1976)
The effect of water, sodium overloading and diuretics upon urinary Kallikrein.
In: Kinins: Pharmacodynamics and Biological Roles; eds. Sicuteri, F., Back, N. and Haberland, G.L., p. 361-370

DAMAS, J., et DEBY, C. (1974)
Libération de prostaglandines par la bradykinin chez le rat.
Comptes Rendues des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales 168, 2-3

DAVIES, A.G. (1970)
Histological changes in the seminiferous tubules of immature mice following administration of gonadotropins.
J. Reprod. Fert. 25, 21-28

DAVIES, R.V., MAIN, S.J. and SETCHELL, B.P. (1978)
Inhibin: Evidence for its existence, methods of bioassay and nature of the active material.
Int. J. Andrology, Suppl. 2, Part 1, 102-114

DINIZ, C.R. and CARVALHO, I.F. (1963)
A micro-method for the determination of bradykininogen under several conditions.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 77-89

DYM, M. and CLERMONT, Y. (1970)
Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis.
Am.J.Anat. 128, 265-282

DYM, M. and FAWCETT, D.W. (1970)
The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium.
Biol. Reprod. 3, 308-326

v. EBNER, V. (1888)
Zur Spermatogenese bei den Säugethieren.
Arch. Mikroskop. Anat. Entwicklungsgeschichte 31, 236-292

EDDY, E.M. (1974)
Fine structural observations on the form and distribution of nuage in germ cells of the rat.
Anat. Rec. 178, 731-758

EIGEL, T. (1974)
Histologische und autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik der Wandzellen während der Evolution der II-Gonozyten.
Inaug. Diss., Düsseldorf

EIGEL, T., LIPPERS, P., HILSCHER, W., HILSCHER, B. und GAUSS, G. (1974)
Histologische und autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik der Wandzellen und Keimstränge bei der Wistarratte.
Autorenreferat der Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung der Haustiere am 22. und 23. Februar 1974 in München.

ELAZAB, E.A. (1966)
Die Auswirkung lokaler Wärmeapplikation am Skrotum auf die Spermatogenese, Reifung der Spermien im Nebenhoden und die Spermabeschaffenheit bei Kaninchen und Stieren.
vet.-med. Diss., München

ERDÖS, E.G. (1970)
Bradykinin-Kallidin and Kallikrein.
Handbook of Experimental Pharmacology,
Vol. XXV, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

ERHARDT, W., PETROWICZ, O. und HUBER, P. (1974)
Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung proliferativer Vorgänge durch ein proteolytisches Enzym.
Med. Welt 25, 1156-1157

ERICSSON, R.J. (1972)
Prostaglandins (E_1 and E_2) and reproduction in the male rat.
Adv. Biosc. 9, 737-742

FASCIOLO, I.C. and HALVORSEN, K. (1964)
Specificity of mammalian kallidinogen.
Am. J. Physiol. 207, 901-905

FAWCETT, D.W. (1975)
Ultrastructure and function of the Sertoli cell.
In: Handbook of Physiology, Vol. I, Male Reproductive System, ed. by Hamilton, D.W. and Greep, R.O., Washington, D.C.
Am. Physiol. Soc., Sect. 7, p. 21-55

FAWCETT, D.W. and PHILLIPS, D.M. (1969)
The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon.
Anat. Rec. 165, 153-184

FIEDLER, F. (1975)
Pig pancreatic Kallikrein A and B.
In: Methods in Enzymology, Vol. XIX, ed. Lorand, L.
Academic Press, New York, p. 289-303

FIEDLER, F. und WERLE, E. (1967)
Vorkommen zweier Kallikreinogene im Schweinepankreas und Automation der Kallikrein- und Kininogenbestimmung.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1087-1089

FIEDLER, F., FRITZ, H. und WERLE, E. (1967)
Heterogenität, Bausteinanalyse und enzymatische Eigenschaften des Kallikreins aus Schweinepankreas.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1231-1232

FIEDLER, F., HIRSCHAUER, Ch. und WERLE, E. (1970)
Anreicherung von Präkallikrein B aus Schweinepankreas und Eigenschaften verschiedener Formen des Pankreaskallikreins.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 351, 225-238

FIEDLER, F., HIRSCHAUER, Ch. and WERLE, E.(1975)
Characterization of Pig Pancreatic Kallikrein A and B.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1879-1891

FIEDLER, F., MÜLLER, B. und WERLE, E. (1971)
Aminosäuresequenz im Bereich des Serins im aktiven Zentrum des Kallikreins aus Schweinepankreas.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1463-1464

FIEDLER, F., EHRET, W., GODEC, G., HIRSCHAUER, C., KUTZBACH, C., SCHMIDT-KASTNER, G. und TSCHESCHE, H. (1977)
The primary sturcture of pig pancreatic kallikrein B. In: Kininogenases, Kallikrein, Physiological Properties and Pharmacological Rationale 4, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W. and Suzuki, T., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 7-14

FISCHER, H.A. und WERNER (1971)
Autoradiographie
DeGruyter und Co., Berlin

FORELL, M.M. (1963)
Therapy with Kallikrein and protease inhibitors.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 368-375

FOUQUET, J.P. (1972)
Physiologie cellulaire: Le méchanisme de la spermiation chez le Hamster: signification des relations entre cellules de Sertoli et spermatides.
C.R.Acad. Sc. Paris 1275,2026 Série D

FREY, E.K. (1926)
Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 142, 663-669

FREY, E.K. und HARTENBACH, W. (1953)
Experimentelle Grundlagen der Wirkung von Depot-Padutin.
Dtsch. med. Wschr. 78, 5-8

FREY, E.K., HARTENBACH, W. und SCHULTZ, F. (1953)
Depot-Padutin und seine therapeutische Verwendbarkeit.
Münch. med. Wschr. 95, 11-15

FREY, E.K., KRAUT, H. und WERLE, E. (1968)
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

FRITZ, H. (1975)
The Kallikrein-Kinin-System in reproduction-Biochemical aspects.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 9-16

FRITZ, H. (1978)
Biochemische Aspekte einer Kallikrein-anwendung.
Fortschritte der Andrology 6, 6-15

FRITZ, H., ECKERT, I. und WERLE, E. (1967)
Isolierung und Charakterisierung von sialinsäure-haltigem und sialinsäurefreiem Kallikrein aus Schweinepankreas.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1120-1132

FRITZ, H., SCHIESSLER, H. and SCHLEUNING, W.-D. (1972)
Proteinases and proteinase inhibitors in the fertilisation process: New concept of control.
Adv. Biosc. 10, 271-286

FROMANTIN, M., PERIN, G., GAUTIER, D. and THABAUT, A. (1975)
Treatment of oligo-astenozoospermias with Kallikrein.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 151-154

GERICKE, D. and CHANDRA, P. (1969)
Inhibition of tumor growth by nucleoside cyclic 3'5'monophosphates.
Z.Physiol. Chem. 350, 1469-1471

GIER, H.F. and MARION, G.D. (1970)
Development of the mammalian testis.
In: The Testis. Vol. I, ed. by Johnson, A.D., Gomes, W.R. and Vandmark, N.L. Academic Press, New York and London, p. 2-46

GILULA, N.B., FAWCETT, D.W. and AOKI, A. (1976)
The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis.
Developmental Biology 50, 142-168

GLOVER, T.D. (1966)
The influence of temperature on flow of blood in the testis and skrotum of rats.
Proc. Roy. Soc. Med. 59, 765-766

GRÄGEL, M. (1974)
Der Einfluß von FSH auf das Wachstum der Tubuli seminiferi bei der präpubertären Ratte.
vet.-med. Diss., München

HABERMANN, E. (1962)
Trennung und Reinigung von Pankreaskallikreinen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 328, 15-23

HABERMANN, E. und BLENNEMANN, G. (1964)
Über Substrate und Reaktionsprodukte der kininbildenden Enzyme Trypsin, Serum- und Pankreaskallikrein sowie von Crotulusgift.
Arch. exp. Path. Pharmacol. 249, 357-373

HAENDLE, H., FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I. und WERLE, E. (1965)
Über einen hormonabhängigen Inhibitor für proteolytische Enzyme in männlichen accessorischen Geschlechtsdrüsen und im Sperma.
Hoppe-Speyler's Z. phys. Chem. 343, 185-188

HALL, P.F. (1965)
Influence of temperature upon the biosynthesis of testosterone by rabbit testis in vitro.
Endocrinology 76, 396-402

HALL, P.F. (1970)
Endocrinology of the testis.
In: The Testis, Vol. II, ed. by Johnson, A.D., Gomes, W.R. and Vandemark, N.L., Academic Press, New York, p. 2-57

HANSSON, V., REUSCH, E., TRYGSTAD, O., TORGERSEN, O., RITZEN, E.M. and FRENCH, F.S. (1973)
FSH stimulation of testicular androgen binding protein.
Nature(Lond.) New Biol. 246, 56-58

HANSSON, V., WEDDINGTON, S.C., NAESS, O., ATTRAMADAL, A., FRENCH, F.S., KOTITE, N., NAYFEH, S.N. and RITZEN, E.M.(1975)
Testicular androgen binding protein (ABP): A parameter of Sertoli cell secretory function.
In: Hormonal Regulation of Spermatogenesis, French, F.S., Hansson, V., Nayfeh, S.N. and Ritzén, E.M., Plenum Press, New York, p. 323-336

HARTENBACH, W. (1954)
Über den heutigen Stand der experimentellen und klinischen Untersuchungen der Wirkung und Anwendungsmöglichkeit von Padutin.
Münch.med.Wschr. 96, 42-44

HELLER, C.G. and CLERMONT, Y. (1963)
Spermatogenesis in man: an estimate of its duration.
Science 140, 184-186

HENNIG, A. (1958)
Kritische Betrachtung zur Volumen- und Oberflächenmessung in der Mikroskopie.
Zeiss Werkzeitschrift 6, 78-86

HILSCHER, B., HILSCHER, W. und GAUSS, G. (1972a)
Autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik der Präspermatogenese und Spermatogenese der Wistarratte.
Zuchthygiene 7, 1-14

HILSCHER, B., HILSCHER, W. und GAUSS, G. (1973)
Zur Altersabhängigkeit der Zyklusdauer beim Samenepithel adulter Wistarratten.
Autorenreferat der Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung der Haustiere am 22. und 23. Februar in München

HILSCHER, B., HILSCHER, W. und MAURER, W. (1969)
Autoradiographische Untersuchungen über den Modus der Proliferation und Regeneration des Samenepithels der Wistarratte.
Z. Zellforsch. 94, 593-604

HILSCHER, B., HILSCHER, W., BÜLTHOFF-OHNOLZ, B., KRÄMER, U., BIRKE, A., PELZER, H. and GAUSS, G. (1974a)
Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis.
Cell. Tiss. Res. 154, 443-470

HILSCHER, W. (1964)
Beiträge zur Orthologie und Pathologie der "Spermatogoniogenese" der Ratte.
Beitr.path. Anat. 130, 69-132

HILSCHER, W. (1973)
Kinetik der Präspermatogenese.
68. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Lausanne, 8. - 12.4.1973

HILSCHER, W. (1974)
Kinetik der Präspermatogenese und Spermatogenese
Verh. Anat. Ges. 68, 39-62

HILSCHER, W. und HILSCHER, B. (1969)
Autoradiographische Untersuchungen über die Kinetik der Spermatogenese der Wistarratte unter besonderer Berücksichtigung der Spermatocytogenese.
Z. Zellforsch. 96, 625-640

HILSCHER, W. and HILSCHER, B. (1976)
Kinetics of the male gametogenesis.
Andrologie 8, 105-116

HILSCHER, W. und MAKOSKI, H.B. (1968)
Histologische und autoradiographische Untersuchungen zur Präspermatogenese und Spermatogenese der Ratte.
Z. Zellforsch.mikr.Anat. 86, 327-350

HILSCHER, W. und MAURER, W. (1962)
Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdoppelung und ihres zeitlichen Verlaufs bei Spermatogonien der Ratte durch Doppelmarkierung mit C-14- und H-3-Hymidin.
Naturwissenschaften 49, 352-352

HILSCHER, W., HILSCHER, B. und FABRICIUS, F. (1976)
Vergleichende autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik der frühen Spermatogenese der Ratte und des Menschen.
Autorenreferat der Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung der Haustiere am 19. und 20. Februar in Hannover

HILSCHER, W., HILSCHER, B. und GAUSS, G. (1972b)
Histologische und autoradiographische Untersuchungen zum Proliferationsmodus der Stützzellen der Wistarratte.
Autorenreferat der Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung der Haustiere am 17. und 18. Februar in München.

HILSCHER, W., HILSCHER, B. und GAUSS, G. (1974b)
Histologische und autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik der Oogonien und Androgonien bei der Wistarratte.
Autorenreferat der Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung der Haustiere am 22. und 23. Februar in München

HILSCHER, W., HILSCHER, B., DELLBRÜCK, G. und LEROUGE-BENARD, B. (1972c)
Autoradiographische Bestimmung der S-Phasendauer der Gonozyten der Wistarratte durch Einfach- und Doppelmarkierung.
Z. Zellforsch. 125, 229-251

HILSCHER, W., HILSCHER, B., GAUSS, G., LIPPERS, P. und BÜLTHOFF, B. (1972d)
Untersuchungen zur Kinetik der Gonozyten und Stützzellen der Wistarratte unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Andrologie 4, 311-325

HOCHEREAU-deREVIERS, M.-T. (1970)
Etudes des divisions spermatogoniales et du renouvellement de la spermatogonie souche chez le taureau.
Thèse Dr., Paris (zitiert nach Hilscher et al., 1972d)

HOCHEREAU-deREVIERS, M.T. (1976)
Variation in the stock of testisular stem cells and in the yield of spermatogonial divisions in ram and bull testes.
Andrologia 8, 137-146

HOMMONAI, Z.T., PAZ, G., SOFER, A., KRAICER, P.T. and HARELL, A. (1976)
Effect of caffeine on the motility, viability, oxygen consumption and glycolytic rate of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa.
Int.J. Fert. 21, 163-170

HOTCHKISS, R.D. (1948)
A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations.
Arch. Biochem. 16, 136-141

HUCKINS, C. (1965)
Duration of spermatogenesis in pre- and post-puberal Wistar rats.
Anat. Rec. 151, 364 (Abstract)

HUCKINS, C. (1971a)
The spermatogonial stem cell population in adult rats. II. A radioautographic analysis of their cycle properties.
Cell Tiss. Kin. 4, 313-334

HUCKINS, C. (1971b)
The spermatogonial stem cell population in adult rats. III. Evidence for a long cycling population.
Cell Tiss. Kin. 4, 335-349

HUNTER, J.D. (1973)
Autoradiographic studies of gonadotrophic action on germ cell maturation rate.
J. Endocrinology 58, 133-134

IBACH, D., WEISSBACH, L. und KOWALD, B. (1976)
Quantitative Parameter zur lichtmirkoskopischen Beurteilung der Hodentubuli.
Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung der Haustiere am 19. und 20. Februar in Hannover

IGARASHI, M., SATO, S., KUBO, H. und SATO, T. (1962a)
Über die Wirkung von Kallikrein auf die Funktion des Hypophyse-Gonadensystems.
Endocrinol. Japon. 9, 81-89

IGARASHI, M., SATO, S. und KUBO, H. (1962b)
Ovulationsauslösung bei der Frau mit Kallikrein.
Zbl. Gynäkol. 84, 161-168

IKEDA, K., TANAKA, K. and KATORI, M. (1975)
Potentiation of bradykinin-induced vascular permeability increased by PGF_{2a} and arachidonic acid in rabbit skin.
Prostaglandins 10, 747-758

ISHIGAMI, J. and KAMIDONO, S. (1975)
Clinical experiences with Kallikrein in male infertility.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds., Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 155-166

JOST, A. (1972)
Becoming a male.
Adv. Biosc. 10, 3-13

KLEEBERG, S., PRINZEN, R. and LEIDL, W. (1975)
Effect of Kallikrein on the gonads of premature male rats.
Kininogenases, Kallikrein 2, Physiological Properties and Pharmacological Rationale Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 99-106

KNUDSON, O.(1961)
Sticky chromosomes as a cause of testicular hypoplasia in bulls.
Acta vet. scand. 2, 1-14

KOPPELMANN, L.E., MOORE, T.C., LEMMI, C.A.E. and PORTER, D.D. (1975)
Accumulation of mononuclear cells and growth-slowing of SV-40-Hamster Fibrosarcomas following intra-Tumor-injection of Bradykinin.
Abstract. Kinins 85, Int. Symposium on Vaso-peptides Fresole, July 15th, 16th, 17th 1975

KRAUSE, W. (1973)
Quantitative Untersuchungen zur normalen prä-natalen Entwicklung von Gonozyten, Stützzellen und Leydigzellen im Hoden der Maus.
Andrologie 5, 15-20

KRAUT, H., FREY, E.K. und BAUER, E. (1928)
Über ein neues Kreislaufhormon. II. Mitteilung.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 175, 97
(zit. nach FREY et al., 1968)

KRAUT, H., FREY, E.K. und WERLE, E. (1930)
Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 189, 97-106

KUTZBACH, L. and SCHMIDT-KASTNER, G. (1972)
Kallikrein from Pig Pankreas.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1099-1106

LACY, D. (1967)
Die Samenkanälchen der Säuger.
Endeavour 26, 101-108

LACY, D. and PETTIT, A.J. (1970)
Sites of hormone production in the mammalian testis and their significance in the control of male fertility.
Brit. med. Bull. 26, 87-91

LANDLEITNER, B., GELDMACHER, J., FEUSTEL, H. und ITTNER, F. (1974)
Einfluß von Kallikrein auf die Bindegewebsproliferation im Tierversuch.
Med. Welt 25, 1752-1755

LEBLOND, C.P. and CLERMONT, Y. (1952a)
Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 55, 548-573.

LEBLOND, C.P. and CLERMONT, Y. (1952b)
Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea-pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technic.
Am. J. Anat. 90, 167-216

LEIDL, W. (1968)
Steuerung und Beeinflussung der Samenbildungprozesse.
Zschr. f. Tierzüchtung u. Züchtungsbiologie 84, 273-289

LEIDL, W. and WASCHKE, B. (1970)
Comparative ascpects of the kinetics of the spermiogenesis.
Morphological Aspects of Andrology 1, 21-24

LEIDL, W., BENTLEY, M.I. and GASS, G.H. (1976)
Longitudinal growth of the seminiferous tubules in LH and FSH treated rats.
Andrologia 8, 131-136

LEIDL, W., PRINZEN, R. and SCHEFELS, W. (1975a)
Clinical research on the effect of Kallikrein on sexual functions in bulls.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 167-170

LEIDL, W., PRINZEN, R., SCHILL, W.-B. and FRITZ, H. (1975b)
The effect of Kallikrein on motility and metabolism of spermatozoa in vitro.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 33-40

v. LENHOSSEK, M. (1898)
Untersuchungen über Spermatogenese.
Arch. Mikr. Anat. 51, 215-318

MacLEOD, J. and HOTCHKISS, R.S. (1941)
The effect of hyperpyrexia upon spermatozoa counts in men.
Endocrinology 28, 780-784
(zit. nach Venkatachalam und Ramanatan, 1962)

LEWIS, G.P. (1963)
Pharmacological actions of Bradykinin and its role in physiological and pathological reactions.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 236-249

LIPPERS, P. (1972)
Beiträge zur Kinetik der Stützzellen und Wandzellen während der Evolution der II-Gonozyten; histologische und autoradiographische Untersuchungen an Hoden von Wistarratten.
Inaug. Diss. Düsseldorf

LLAURADO, J.G. and DOMINGUEZ, O.V. (1963)
Effect of cryptorchidism on testicular enzymes in adrogen biosynthesis.
Endocrinology 72, 282-295

LÖBBECKE, E.-A. (1973)
Effect of Kallikrein on the proliferation of various cell systems.
In: Kininogenases Kallikrein. 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rationale, eds. Haberland, G.L., J.W. Rohen, Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 161-170

LOHSTROH, A.J. (1976)
Hormonal control of spermatogenesis.
In: Mechanisms of Male Reproductive Physiology, eds. Spilman, C.H., Lobl, I.J. and Kirton, K.T., p. 13-23

LUPULESCU, A. (1975)
Effect of prostaglandin on protein, RNA, DNA and collagen synthesis in experimental wounds.
Prostaglandins 10, 573-580

MANDEL, P., RODESCH, J. and MAINTZ, J.M. (1973)
The treatment of experimental radiation lesions by Kallikrein.
In: Kininogenases, Kallikrein:1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rationale, eds. Haberland, G.L., J.W. Rohen, Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p.171-188

MANN, K., GEIGER, G. and WERLE, E. (1976)
A sensitive kinin liberating assay for kininogenase in rat urine, isolated glomeruli and tubules of rat kidney.
Adv.exp. Med.Biol. 70, 65-73

MANTZ, J.M., MANDEL, P., MICHAELIDIS, P., DELEMEN, M. and RODESCH, J. (1969)
Biochemical and cytological study of the effects of Kallikrein on the bone marrow of the white rat after whole-body irradiation (800R).
7/1478 Euratom Microfilm EUR 4123F

MacMANUS, J.P. and WHITFIELD, J.F. (1969a)
Mediation of the mitogenic action of growth hormone by 3'5'-monophosphate (cyclic AMP).
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 132, 409-412

MacMANUS, J.P. and WHITFIELD, J.F. (1969b)
Stimulation of deoxribonucleic acid synthesis and mitotic activity of thymic lymphocytes by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate.
Exp.Cell Res. 58, 188-191

MacMANUS, J.P. and WHITFIELD, J.F. (1971)
Cyclic AMP mediated stimulation by Calcium of thymocyte proliferation.
Exp. Cell. Res. 69, 281-288

MacMANUS, J.P., WHITFIELD, J.F. and BRACELAND, B. (1971a)
The metabolism of exogenous cyclic AMP at low concentrations by thymic lymphocytes.
Biochem. Biophys. 42, 503-509

MacMANUS, J.P., YOUDALE, T., WHITFIELD, J.F. and FRANKS, D.J. (1971b)
The mediations by calcium and cyclic AMP of the stimulatory action of parathyroid hormone on thymic lymphocyte proliferation.
In: Calcium, Parathormone, and the Calcitonins, eds. Talmage, V. and Munson, P.L., Excerpta medica (Amst.), p. 338-350

MARIN-GREZ, M. and CARRETERO, O.A. (1973)
The relationship between urinary Kallikrein and natriuresis.
In: Kininogenases, Kallikrein: 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rational, eds. Haberland, G.L. and Rohen, J.W., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p.113-122

MASSART, A. and RODESCH, J. (1962)
Rapp. EUR 125F
(zit. nach MANDEL et al., 1973)

MATTHIESSEN, P.F. and ROHEN, J.W. (1975)
3H-Thymidine-incorporation in the testis of the albino rat after ligation of the pancreatic duct. In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 75-84

MAUSS, J. (1973)
Eine neue Methode zur Überprüfung von Umweltfaktoren auf die Spermatogenese bei der Ratte. Andrologie 5, 159-162

MOORE, C.R. (1924)
Properties of gonads as controllers of somatic and psychical characteristics. VI. Testicular reactions in experimental cryptorchidism. Am. J. Anat. 34, 269-316 (zit.nach CLEGG, 1963)

MOORE, C.R. and OSLUND, R. (1923)
Experiments on the sheep testis-cryptorchidism, vasectomy and scrotal insulation. Am. J. Phys. 67, 595-607 (zit.nach BOWLER,1972)

MORIWAKI, C., KIZUKI, K., and MORIYA, H. (1975)
Kininogenases from the coagulating gland. In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 23-32

MORIYA, H., YAMAZUKI, K., FUKUSHIMA, H. and MORIWAKI, C. (1965)
Biochemical studies on kallikreins and their related substances. J. Biochem. (Tokyo) 58, 208-215

MUDRA, A. (1958)
Statistische Methoden für landwirtschaftliche Versuche.
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

MÜLLER, E. und BRANDl, G. (1977)
Untersuchungen über den Einfluß von Kallikrein auf Merkmale der Ejakulate von Problemstieren.
Zuchthygiene 12, 24-28

MURPHY, M.D. (1965)
Sertoli cell stimulation following intratesticular injections of FSH in the hypophysectomized rat.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 118, 1202-1205

NIEMI, M. and KORMANO, M. (1964)
Cell renewal in the interstitial tissue of postnatal prepuberal rat testis.
Endocrinology 74, 996-998

NÖLLER, H.G. (1955)
Die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus.
Klin.Wschr. 33, 770-771

NOVI, A.M. and SABA, P. (1968)
An electron microscopic study of the development of rat testis in the first 10 postnatal days.
Z.Zellforsch. mikr. Anat. 86, 313-326

OAKBERG, E.F. (1955)
Sensitivity and time of degeneration of spermatogenetic cells irradiated in various stages of maturation in the mouse.
Rad. Res. 2, 369-391

OAKBERG, E.F. (1956)
Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium.
Am. J. Anat. 99, 507-516

ODELL, W.D., SWERDLOFF, R.S., JACOBS, H.S. and HESCOX, M.A. (1973)
FSH induction for sensitivity to LH: one cause of sexual maturation in the male rat.
Endocrinology 92, 160-165

OKADA, K. (1970)
Experimental study on the proliferation and the maturation of germ cell, Sertoli cell and Leydig cell of the rat testis.
Jap. J. Urol. 61, 1146
(zitiert nach Dissertation Grägel, 1974)

ORTAVANT, R. (1954)
Contribution à l'étude de la durée du processus spermatogénétique du bélier à l'àide de P-32.
Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris) 148, 804-806

OTRAVANT, R. (1956)
Autoradiographie des cellules germinales du testicule de bélier. Durée des phénomèns spermatogénétiques.
Arch. Anat. mic. Morph. exp. 45, 1-10

ORTAVANT, R. (1958)
Le cycle spermatogénétique chez le bélier.
Thèse Dr. es Sciences, Paris
zitiert nach Hochereau-deReviers 1976

ORTAVANT, R., COUROT, M. and HOCHEREAU, M.T. (1969)
Spermatogenesis and morphology of the spermatozoon.
In: Reproduction in Domestic Animals, ed. by Cole and Cupps Second Edition, p. 251-276.

PALM, S. and FRITZ, H. (1975)
Components of the Kallikrein-Kinin-System in human midcycle cervical mucus and seminal plasma.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 17-22

PALM, S., SCHILL, W.-B., WALLNER, O., PRINZEN, R. and FRITZ, H. (1976)
Occurence of components of the Kallikrein-Kinin-system in human genital tract secretions and their possible function in stimulation of sperm motility and migration.
In: Kinins: Pharmacodynamics and Biological Roles, eds. Sicuteri, F., Back, N. and Haberland, G.L., p. 271-279

PEREY, B., CLERMONT, Y. and LEBLOND, C.P. (1961)
The wave of the seminiferous epithelium in the rat.
Am. J. Anat. 108, 47-77

PERRIS, A.D. and WHITFIELD, J.F. (1969)
The mitogenic action of Bradykinin on thymic lymphocytes and its dependence on calcium.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 130, 1198-1201

PLESS, J., STÜRMER, E., GUTTMANN, S. und BOISSONNAS, R.A. (1962)
Kallidin, Synthese und Eigenschaften.
Helv. chim. Acta. 45, 394-396

PRINZEN, R. (1975)
Die Wirkung von Kallikrein auf den Stoffwechsel und die Motilität von Bullenspermien.
Autorenreferat der Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung der Haustiere am 25. und 26. Februar in München.

QUASTLER, H. and SHERMAN, F.G. (1959)
Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exp. Cell. Res. 17, 420-438

RAMOS, A.S. (1975)
Effects of aspirin and prostaglandin E_2 on the rat testis: a histological, histochemical and ultrastructural study.
Dissertation Abstracts International, B 36, 2101
Texas A and M. University, USA

REGAUD, C. (1901)
Etudes sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogenèse chez les mammifers.
Arch. Anat. Microscop. 4, 101-156

RIXON, R.H. and WHITFIELD, J.F. (1973)
Kallikrein, Kinin and Cell Proliferation.
In: Kininogenases Kallikrein. 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rationale, ed. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p.131-146

RIXON, R.H., WHITFIELD, J.F. and BAYLISS, J. (1971)
The stimulation of mitotic activity in the thymus and bone marrow of rats by Kallikrein.
Horm. Metalb. Res. 3, 279-284

ROBERTS, S.J. (1971)
Veterinary obstetrics and genital diseases.
Ihaca, New York

ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W. and SUTHERLAND, E.W. (1971)
Cyclic AMP.
Academic Press, New York

ROCHA e SILVA, M., BERALDO, W.T. and ROSENFELD, G. (1949)
Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin.
Am.J. Physiol. 156, 261-273

ROCHA e SILVA, M. (1963)
The physiological significance of Bradykinin.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 190-211

ROHEN, J.W. and BUSCHHÜTER, H. (1975)
Karyometric measurements on the Sertoli cell nuclei in kallikrein-treated albino rats.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C., and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 85-98

ROHEN, J.W. and PETERHOFF, I. (1973)
Stimulation of mitotic activity by Kallikrein in the gastrointestinal tract of rats.
In: Kininogenases Kallikrein. 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rationale, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 147-158

ROHEN, J.W. and STUTTMANN, R. (1977)
The early postnatal development of the germinative epithelium on the testis in the albino rat under influence of kallikrein.
In: Kininogenases, Kallikrein, Physiological Properties and Pharmacological Rationale 4, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W. and Suzuki, T., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p.217-224

ROMEIS, B. (1968)
Mikroskopische Technik.
Verlag R. Oldenbourg, München

ROMMERTS, F.G., LOOKE, B.A. and van der MOLEN, H. (1974)
The role of cyclic AMP in the regulation of steroid biosynthesis in testicular tissue.
J. Steroid Biochem. 5, 279-285

deROOIJ, D.G. and KRAMER, M.T. (1968)
Spermatogonial stem cell renewal in the rat, mouse and golden hamster.
Z. Zellforsch. 92, 400-405

ROOSEN-RUNGE, E.C. (1951)
Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. II. The duration of spermatogenesis and some effects of colchicine.
Am. J. Anat. 88, 163-176

ROOSEN-RUNGE, E.C. (1955)
Untersuchungen über die Degeneration samenbildender Zellen in der normalen Spermatogenese der Ratte.
Z. Zellforsch. 41, 221-235

ROOSEN-RUNGE, E.C. (1962)
The process of spermatogenesis in mammals.
Biol. Rev. 37, 343-377

ROOSEN-RUNGE, E.C. (1973)
Germinal cell loss in normal metazoan spermatogenesis.
J. Reprod. Fert. 35, 339-348

ROOSEN-RUNGE, E.C., and ANDERSON, D. (1959)
The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat.
Acta anatomica 37, 125-137

ROOSEN-RUNGE, E.C., and GIESEL, L.O. (1950)
Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat.
Am. J. Anat. 87, 1-30

ROOSEN-RUNGE, E.C., and LEIK, J. (1968)
Gonocyte degeneration in the postnatal male rat.
Am. J. Anat. 122, 275-300

ROTHSCHILD, A.M., GOMES, J.C. and CASTANIA, A. (1976)
Adrenergic and cholinergic control of the activity of the Kallikrein system in rat blood.
In: Kinins: Pharmacodynamics and Biological Roles, eds. Sicuteri, F., Back, N. and Haberland, G.L., p. 197-200

RUGH, R. and SKAREDOFF, L. (1971)
The immediate and delayed effects of 1000r X-rays on the rodent testis.
Fert. Ster. 22, 73-82

RUSSEL, L.D. (1977)
Movement of spermatocytes from basal to the adluminal compartment of the rat testis.
Am. J. Anat. 148, 313-328

SAAMELI, K. and ESKES, T. (1962)
Bradykinin and cardiovascular system: Estimation of half-life.
Fed. Proc. 21, 400 (Abstract)

SCHALLY, A.V., KASTIN, A.J. and ARIMURA, A. (1972)
The hypothalamus and reproduction.
Am. J. Obstet Gynecol. 114, 423-441

SCHILL, W.-B. (1975a)
Erste Ergebnisse der Behandlung von männlichen Fertilitätsstörungen mit Kallikrein: Asthenozoospermie.
Der Hautarzt 26, 430-432

SCHILL, W.-B. (1975b)
Die Bedeutung proteolytischer Spermaenzyme für die Fertilität.
Der Hautarzt 26, 514-523

SCHILL, W.-B. (1975c)
Erste Ergebnisse einer parenteralen Behandlung von männlichen Fertilitätsstörungen mit Kallikrein: Oligozoospermie.
Der Hautarzt 26, 541-542

SCHILL, W.-B. (1975d)
Therapie bei Oligozoospermie.
Der Hautarzt 26, 663-664

SCHILL, W.-B. (1975e)
Influence of the Kallikrein-Kinin-System on human sperm motility in vitro.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C., and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 47-58

SCHILL, W.-B. (1975f)
Influence of Kallikrein on sperm count and sperm motility in patients with infertility problems: preliminary results during parenteral and oral application with special reference to asthenozoospermia and oligozoospermia.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C., and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 129-146

SCHILL, W.-B. (1975g)
Increased fructolysis of kallikrein-treated human spermatozoa.
Andrologia 7, 105-107

SCHILL, W.-B. (1975h)
Caffeine- and kallikrein-induced stimulation of human sperm motility: a caomparative study.
Andrologiy 7, 229-236

SCHILL, W.-B. (1977)
Kallikrein as a therapeutical means in the treatment of male infertility.
In: Kininogenases, Kallikrein, Physiological Properties and Pharmacological Rationale 4, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W. and Suzuki, T., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p.251-280

SCHILL, W.-B. and HABERLAND, G.L. (1974a)
Kinin-induced enhancement of sperm motility.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. 335, 229-231

SCHILL, W.-B. und HABERLAND, G.L. (1974b)
In vitro-Untersuchungen zur Frage der Wirkung von Kallikrein und Kininen auf die Spermatozoen-motilität.
Der Hautarzt 25, 245

SCHILL, W.-B. und HABERLAND, G.L. (1975)
Wirkungen von verschiedenen Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Spermatozoen-motilität in vitro.
Klin. Wschr. 53, 73-79

SCHILL, W.-B., BRAUN-FALCO, O. and HABERLAND, G.L. (1974)
The possible Role of Kinins in sperm motility.
Int. J. Fert. 19, 163-167

SCHIRREN, C. (1975)
Experimental studies on the influence of Kallikrein on the human sperm motility in vitro.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 59-62

SCHIRREN, C., SCHILL, W.-B. and HOFMANN, N. (1975)
The influence of Kallikrein on semen parameters of subfertile patients.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 111-128

SCHULZE, C. (1974)
On the morphology of the human Sertoli cell.
Cell. Tiss. Res. 153, 339-355

SCHULZE, C., HOLSTEIN, A.F., SCHIRREN, C. and KÖRNER, F. (1976)
On the morphology of human Sertoli cells under normal conditions and in patients with impaired fertility.
Andrologia 8, 167-178

SETCHELL, B.P., WAITES, G.M.H. and THORBURN, G.D. (1966)
Blood flow in the testis of the conscious ram, measured with Krypton 85: effects of heat, catecholamines and acetylcholine.
Circulation Research 18, 755-765

STECKER, J.F., LLOYD, M.D. and LLOYD, J.W. (1978)
Leydig and Sertoli cell function in normal and oligospermic males: A preliminary report.
Fert. Ster. 29, 204-207

STEINBERGER, A. and STEINBERGER, E. (1971)
Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture.
Biol. Reprod. 4, 84-87

STEINBERGER, E. (1971)
Hormonal control of mammalian spermatogenesis.
Phys. Rev. 51, 1-22

STEINBERGER, E. and DIXON, W.J. (1959)
Some observations of the effect of heat on the testicular germinal epithelium.
Fert. Ster. 10, 578-595

STEINBERGER, E., STEINBERGER, A. and PERLOFF, W.H. (1964)
Initiation of spermatogenesis in vitro.
Endocrinology 74, 788-792

STRÖBEL, H. (1967)
Histometrische Untersuchungen am Hodeninterstitium von Stieren mit Störungen der Spermatogenese und der Libido.
vet.-med. Dissertation, München.

STÜTTGEN, G. (1973)
Clinical substantiation of the effect of Kallikrein.
In: Kininogenases, Kallikrein: 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rational, eds. Haberland, G.L. and Rohen, J.W., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 189-193

SWIESTRA, E.E. (1968)
Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar. Duration of spermatozoon transit through the epidymis.
Anat. Rec. 161, 171-86

SWIESTRA,E.E. and FOOTE, R.H. (1963)
Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit.
J. Reprod. Fert. 5, 309-322

TAGAKI, S. und KOBAYASHI, O. (1958)
Clinical Endocrinology Jap. 6, 1138 (Japanisch)
zitiert nach Igarashi et al., 1962a

TICE, L.W. and BARNETT, R.J. (1963)
The fine structural localization of some testicular phosphatases.
Anat. Record 147, 43-64

TOBIAS, P.V. (1956)
Chromosomes, sex-cells and evolution in a mammal.
Percy, Lund, Humphries, London
zitiert nach Clermont, 1972

TRAUTSCHOLD, I. und WERLE, E. (1961)
Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner Inaktivatoren.
Z. physiol. Chem. 325, 48-59

TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E. und ZICHGRAF-RÜDEL, G. (1966)
Über den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor.
Arzneimittelforschung 16, 1507-1515

TURNER, C.D. (1938)
Intra-ocular homotransplantation of prepuberal testes in the rat.
Am. J. Anat. 63, 101-149

VENKATACHALAM, P.S. and RAMANATHAN, K.S. (1962)
Effect of moderate heat on the testes of rats and monkeys.
J. Reprod. Fert. 4, 51-56

WAITES, G.H. (1970)
Temperature regulation and the testis.
In: The Testis, Vol. I, ed. by Johnson, A.D., Gomes, W.R. and Vandemark, N.L., Academic Press, New York, p. 241-281

WAITES, G.M.H. and MOULE, G.R. (1961)
Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram.
J. Reprod. Fert. 2, 213-224

WALLNER, O., SCHILL, W.-B., GRÖSSER, A. and FRITZ, H. (1975)
Participation of the Kallikrein-Kinin-System in sperm penetration through cervical mucus-in vitro studies.
In: Kininogenases, Kallikrein: Physiological Properties and Pharmacological Rational-Reproduction, eds. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and Huber, P., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 63-70

WARTENBERG, H. (1976)
Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of the "gonia".
Andrologia 8, 117-130

WERLE, E. (1937)
Über den Aktivitätszustand des Kallikreins der Bauchspeicheldrüse und ihres äußeren Sekretes beim Hund.
Biochem. Z. 290, 129
(zitiert nach FREY et al., 1968)

WERLE, E. (1970)
Discovery of the most important Kallikreins and Kallikrein Inhibitors.
In: Bradykinin, Kallidin and Kallikrein - Handbook of experimental Pharmacology, Vol. XXV; eds. Erdös, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, p. 1-6

WERLE, E. (1973)
History of Kallikrein and some aspects of its chemistry and physiology.
In: Kininogenases, Kallikrein: 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rationale, eds. Haberland, G.L. and Rohen, J.W., Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 7-22

WERLE, E. und von RODEN, P. (1936)
Über das Vorkommen des Kallikreins in den Speicheldrüsen und im Mundspeichel.
Biochem. Z. 286, 213
(zitiert nach FREY et al., 1968)

WERLE, E. und SCHMAL, P. (1968)
Über ein Kallikrein-abbauendes Enzym im Blutplasma der Ratte.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 521-522

WERLE, E., GÖTZE, W. und KEPPLER, A. (1937)
Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz.
Biochem. Z. 289, 217-233
(zit. nach FREY et al., 1968)

WERLE, E., VOGEL, R. und RÜDEL, G. (1964)
Zur Frage der Wachstumswirkung von Kallikrein bei Ratten.
Arch. int. Pharmacodyn. 149, 119-125

WHITFIELD, J.F., MacMANUS, J.P. and GILLAN, D.J. (1970a)
Cyclic AMP mediation of Bradykinin - induced stimulation of mitotic activity and DNA-Synthesis in Thymocytes.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 133, 1270-1274

WHITFIELD, J.F., MacMANUS, J.P. and GILLAN, D.J. (1970b)
The possible mediation by cyclic AMP of the stimulation of thymocyte proliferation by Vasopressin and the inhibition of this mitogenic action by Thyrocalcitonin.
J. Cell Physiol. 76, 65-76

WHITFIELD, J.F., MacMANUS, J.P., BRACELAND, B., and GILLAN, D.J. (1972)
Inhibition by calcium of the cyclic AMP-mediated stimulation of thymic lymphoblast proliferation by prostaglandins E_1.
Horm. Metab. Res. 4, 304-308

WHITFIELD, J.F., MacMANUS, J.P., YOUDALE, T. and FRANKS,D.J. (1971)
The roles of calcium, cyclic AMP in the stimulatory action of parathyroid hormone on thymic lymphocyte proliferation.
J. Cell Physiol. 78, 355-368

WHITFIELD, J.F., RIXON, R.H., MacMANUS, J.P. and BALK, S.D. (1973)
Calcium, cyclic AMP and the control of cell proliferation, in vitro.
J. Amer. Tissue Cult. Assoc. 8, 257-278

WIDMANN, J. (1974)
Beeinflussung des DNS-Gehaltes bei Bullenspermien nach Störung der Spermatogenese durch Wärme.
vet.-med. Diss., München

WITSCHI, E. (1948)
Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds.
Contr. Embryol. Carnege. Inst. 32, 67-80

Herrn Prof. Dr. W. Leidl möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit aufrichtig danken.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für ihre hilfreiche Unterstützung.

Zu großem Dank bin ich Herrn Prof. H. Fritz vom Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie der Universität München verpflichtet für die Durchführung der biochemischen Bestimmungen und die Durchsicht des biochemischen Teils dieser Arbeit. Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Geiger, der an der Durchführung der biochemischen Bestimmungen mitbeteiligt war.

Abschließend danke ich Herrn Prof. W. Hilscher vom Institut für Lufthygiene und Silikoseforschung der Universität Düsseldorf herzlich für die Anfertigung der Autoradiogramme.

LEBENSLAUF

Am 5.3.1950 wurde ich, Sabine Kleeberg-Ruppert, geborene Kleeberg, als Tochter des Tierarztes Dr. Rudolf Kleeberg und seiner Frau Vera, geborene Grönwold, medizinisch-technische Assistentin, in Hamburg geboren.

Von 1956 bis Mitte 1959 besuchte ich die Volksschule in Altomünster/Obb. und wechselte dann im gleichen Jahr auf die Volksschule Mendelssohnstraße in Hamburg-Bahrenfeld. Von 1961 bis 1970 besuchte ich das Neusprachliche Gymnasium für Mädchen, Altona, in Hamburg. Dort bestand ich am 29.1.1970 das Abitur.

Im Sommersemester 1970 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Am 23.5.1975 bestand ich das Staatsexamen. Die Approbation als Tierärztin erhielt ich am 19.11.1976.

Im April 1974 habe ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit begonnen.

Von Februar 1977 bis einschließlich März 1978 arbeitete ich als Tierärztin in der Großtierpraxis von Herrn Dr. F. Werner in Schongau. Am 7.10.1977 habe ich den Diplomkaufmann Wolfgang Ruppert geheiratet. Seit Mai 1978 bin ich als Verwalterin der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München angestellt.